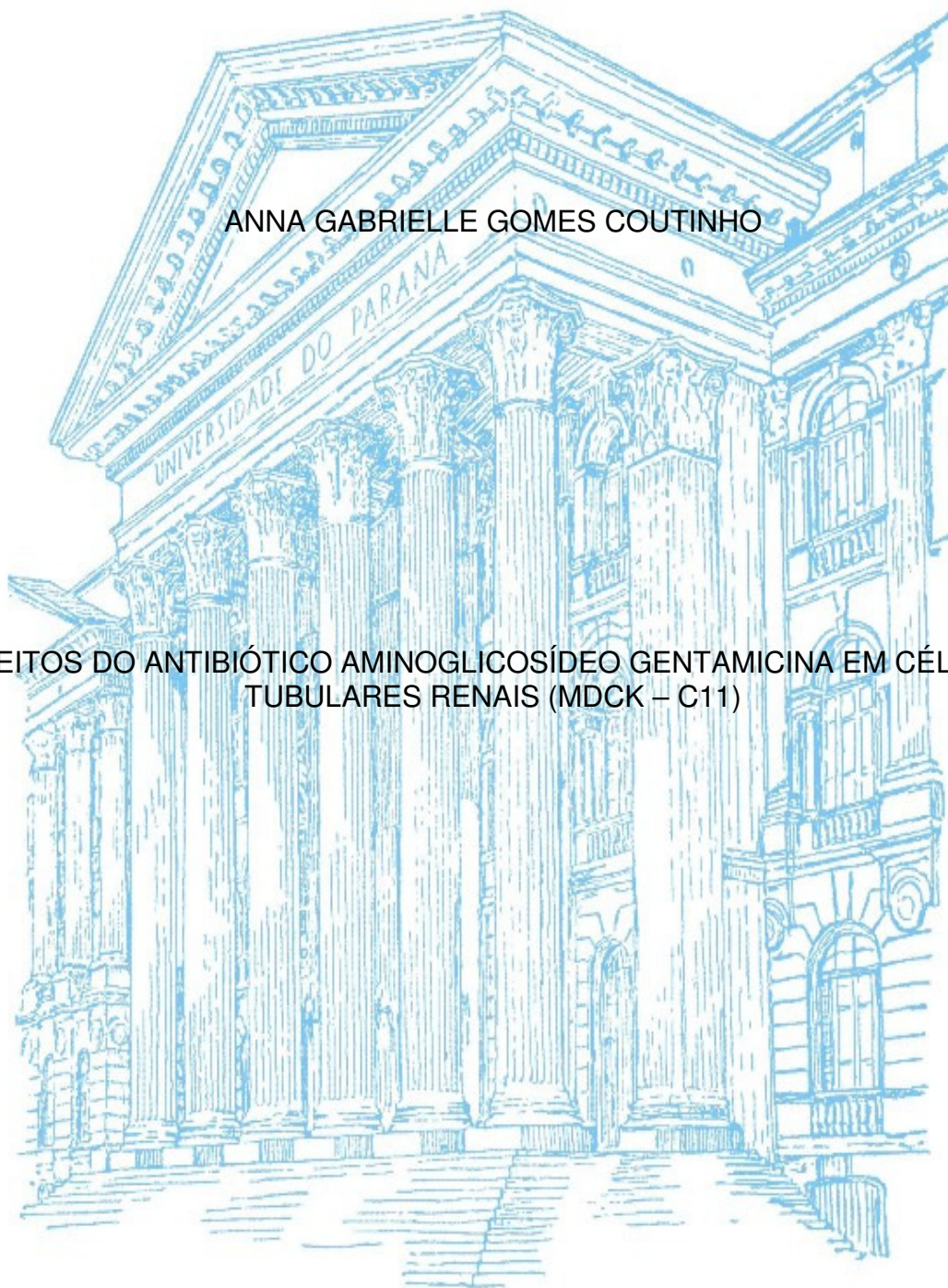


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNA GABRIELLE GOMES COUTINHO

EFEITOS DO ANTIBIÓTICO AMINOGLICOSÍDEO GENTAMICINA EM CÉLULAS
TUBULARES RENAI (MDCK – C11)



CURITIBA
2012

ANNA GABRIELLE GOMES COUTINHO

EFEITOS DO ANTIBIÓTICO AMINOGLICOSÍDEO GENTAMICINA EM CÉLULAS
TUBULARES RENAIIS (MDCK – C11)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
graduação em Fisiologia, Departamento de
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná para a obtenção
do título de Mestre.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Ana Lúcia Tararthuch.

CURITIBA
2012



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

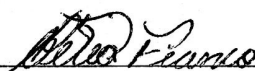


P A R E C E R

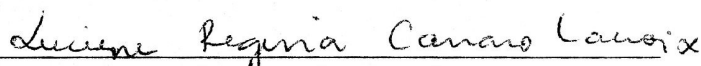
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **ANNA GABRIELLE GOMES COUTINHO** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APPROVAÇÃO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

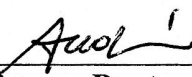
Curitiba, 29 de agosto de 2012



Professora Doutora Célia Regina Cavichiolo Franco
UFPR- Membro Titular



Professora Doutora Luciene Lacroix
UFPR - Membro Titular



Professora Doutora Ana Lucia Tararthuch
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a todos aqueles que estiveram presentes de alguma forma em minha vida e me influenciaram de alguma maneira em minhas escolhas.

À minha mãe, Cristiane Gomes Coutinho, que durante todo o curso de Mestrado sempre me incentivou a continuar e sempre se orgulhou por eu dar continuidade à Graduação em Ciências Biológicas.

À minha avó, Ana Maria Rocha Gomes, que cuidou de mim com muito carinho durante os dias de escrita da tese, quando o tempo é muito precioso.

Ao meu namorado, Fernando Maicon D'Aquino, que sempre deu valor à minha pesquisa, pois sabe quanto o estudo é importante na vida de uma pessoa.

Agradeço muito à minha amiga e colega de laboratório, Priscilla Marys Costa dos Santos, que sempre me ajudou no desenvolvimento dos experimentos e, com sua maior experiência no laboratório, sempre foi muito prestativa em me auxiliar todas as vezes que precisei.

À Prof. Dr^a do Departamento de Biologia Celular, Célia Regina Cavichiolo Franco, que contribuiu muito para esta tese de Mestrado, juntamente com sua co-orientada do Doutorado em Biologia Celular, Stelée Biscaia.

Um agradecimento mais que especial à minha orientadora Prof. Dr^a. Ana Lúcia Tararhuch, que me recebeu no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia com muito carinho e paciência. Agradeço por ter sido essa orientadora tão maravilhosa que foi, sabendo dosar cobrança com compreensão.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fernández Perez, que com sua grande sabedoria, foi muito importante pra mim no desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro prestado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

À Deus, por me oferecer mais uma oportunidade de crescer na vida.

RESUMO

Há muito já se sabe que o antibiótico aminoglicosídeo gentamicina é capaz de provocar danos em células renais. Em células tubulares proximais, receptores de membrana promovem a endocitose da gentamicina, a qual desestabiliza a membrana dos lisossomos. Esta desestabilização da membrana lisossomal está ligada com o fenômeno de apoptose. Além do mais, a gentamicina é capaz de ativar receptor sensível a cálcio (CaSR), presente na membrana apical da célula tubular, o qual tem sido associado com morte celular. Dentre os poucos achados existentes sobre a ação de aminoglicosídeos em células renais distais, sabe-se da participação de receptores de membrana do tipo TRPV (receptores de cátion não seletivos), os quais são capazes de interferir na captação da gentamicina. O objetivo do presente trabalho foi determinar a ação da gentamicina sobre cultura de células do ducto coletor renal (MDCK C11), com a finalidade de se estabelecer seus efeitos sobre as concentrações de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$; sobre o pH_i ; sobre a viabilidade celular através de modificações da integridade da membrana e a citotoxicidade celular gerada pelo antibiótico. Alterações na $[Ca^{2+}]_i$ e no pH_i foram determinadas utilizando-se microscopia de fluorescência. A velocidade de acidificação das células MDCK C11 quando expostas à gentamicina, foi maior do que quando expostas à solução sem sódio ($0,0077 \pm 0,0005$ unidades de pH/segundo e $0,0031 \pm 0,0003$ unidades de pH/segundo, respectivamente). Estes resultados sugerem que a gentamicina poderia provocar algum efeito sobre os mecanismos extrusores de prótons. A $[Ca^{2+}]_i$ aumentou gradativamente quando as células foram expostas à gentamicina por 10, 20 e 30 minutos e de forma mais intensa quando comparado ao aumento provocado pelo gadolínio. A presença de Ca^{2+} no meio extracelular mostrou-se necessária para estimular o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido pela gentamicina, uma vez que utilizando-se EGTA (quelante de cálcio extracelular), este estímulo desaparece. Porém, na presença de cálcio alto no meio extracelular, o efeito da gentamicina foi abolido, indicando uma possível competição entre cálcio e o antibiótico. Adicionando-se um quelante de cálcio de estoques intracelulares (tapsigargina), o aumento do $[Ca^{2+}]_i$ provocado pela gentamicina permaneceu, demonstrando que é possível que este aminoglicosídeo seja capaz de estimular a entrada de cálcio por outras vias que não a do CaSR. Com Microscopia Eletrônica de Varredura, foram observadas modificações morfológicas do epitélio celular exposto ao antibiótico. Através de experimentos medindo a absorbância do corante vermelho neutro, foi demonstrado que a gentamicina diminui a capacidade endocítica da membrana das células. Ainda, com o método do MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), foi possível observar um aumento da atividade mitocondrial provocada pelo antibiótico.

Palavras-chave: células MDCK C11; gentamicina; $[Ca^{2+}]_i$; (pH_i).

ABSTRACT

It is well known that the aminoglycoside antibiotic gentamicin is capable of causing damage to kidney cells. In proximal tubular cells, membrane receptors promote endocytosis of gentamicin, which destabilizes the membrane of lysosomes. This destabilization of the lysosomal membrane is connected with the phenomenon of apoptosis. Moreover, gentamicin is able to activate the calcium sensitive receptor (CaSR) present in the apical membrane of tubular cell, which has been associated with cell death. Among the few existing findings about the effect of aminoglycosides in distal renal cells, it is known the participation of membrane receptors like TRPV (non-selective cation receptors), which are capable of interfering in the uptake of gentamicin. The objective of this study was determine the action of gentamicin on cultured cells of the kidney collecting duct (MDCK C11), in order to establish their effects on intracellular calcium concentrations $[Ca^{2+}]_i$; on intracellular pH $(pH)_i$, and cell viability through modifications of membrane integrity and cellular cytotoxicity generated by the antibiotic. Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i was determined using fluorescence microscopy. The rate of acidification of MDCK C11 cells when exposed to gentamicin was higher than when exposed to the solution without sodium (0.0077 ± 0.0005 pH units/second and 0.0031 ± 0.0003 pH units/second, respectively). These results suggest that gentamicin could cause some effect on proton extrusion. The $[Ca^{2+}]_i$ gradually increased when cells were exposed to gentamicin for 10, 20 and 30 minutes and more intensively as compared to the increase caused by gadolinium. The presence of extracellular Ca^{2+} was found to be necessary to stimulate the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by the gentamicin, since using EGTA (extracellular calcium chelator), this stimulus disappeared. However, in the presence of high calcium in the extracellular environment, the effect of gentamicin was abolished, suggesting a possible competition between calcium and the antibiotic. Adding a drug that depletes intracellular Ca^{2+} stores (thapsigargin), the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by the gentamicin remained, demonstrating that it is possible that this aminoglycoside is able to stimulate the influx of calcium by other routes different than the CaSR. With scanning electron microscopy, morphological changes were observed in epithelial cell exposed to the antibiotic. Through experiments by measuring the absorbance of the dye neutral red, it was demonstrated that gentamicin diminishes endocytic ability of cell membrane. Furthermore, with the MTT method (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), it was observed an increase in mitochondrial activity caused by the antibiotic.

Keywords: MDCK C11 cells; gentamicin; $[Ca^{2+}]_i$; $(pH)_i$.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Progressão do processo inflamatório em células renais levando à falência renal.....	15
Figura 2: Endocitose de um aminoglicosídeo através de um Complexo Endocítico de Membrana	18
Figura 3: Regressão Linear da Curva Padrão com Nigericina	26
Figura 4: Variação na $[Ca^{2+}]_i$ com gentamicina, gadolínio e EGTA.....	34
Figura 5: Variação na $[Ca^{2+}]_i$ com gentamicina	35
Figura 6: Variação na $[Ca^{2+}]_i$ com tapsigargina e bapta	35
Figura 7: Variação na $[Ca^{2+}]_i$ com cálcio alto.....	36
Figura 8: Variação na $[Ca^{2+}]_i$ com cálcio alto mais gentamicina.....	37
Figura 9: Variação na $[Ca^{2+}]_i$ com cálcio alto e com cálcio alto mais gentamicina.....	37
Figura 10: Velocidade de acidificação do pHi na ausência de sódio ($0Na^+$).....	38
Figura 11: Velocidade de acidificação do pHi com exposição à gentamicina	39
Figura 12: Valores médios de acidificação do pHi e ΔpHi	39
Figura 13: Registro de vesículas ácidas.....	40
Figura 14: Absorbância do corante vermelho neutro.....	41
Figura 15: Absorbância do MTT	42
Figura 16: Análise ultraestrutural em MEV das células MDCK C11 expostas à gentamicina por 3 horas e 24 horas	44
Figura 17: Análise ultraestrutural em MEV das células MDCK C11 expostas à gentamicina por 1 hora e 30 minutos	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de soluções	28
Tabela 2: Símbolos utilizados para analisar a MEV	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. GENTAMICINA.....	10
1.2. CÉLULAS MDCK – C11	12
1.3. O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA DOENÇA RENAL.....	13
1.4. EFEITOS DA GENTAMICINA NO GLOMÉRULO E EM CÉLULAS MESANGIAIS	15
1.5. EFEITOS TUBULARES DA GENTAMICINA.....	17
1.5.1. Células Tubulares Proximais	17
1.5.2. Apoptose de células tubulares.....	18
1.5.3. Células do Néfron Distal.....	20
1.5.4. Regulação do pH e o envolvimento do Ca^{2+}_i	22
2. OBJETIVOS	23
2.1. OBJETIVO GERAL	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. CULTIVO CELULAR DO SUBTIPO C11 DE CÉLULAS MDCK.....	24
3.2. REGISTRO DO PH INTRACELULAR.....	24
3.2.1. Registro fluorescente de vesículas ácidas	25
3.2.2. Curva padrão com nigericina (curva de calibração).....	26
3.3. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS VARIAÇÕES NA $[Ca^{2+}]_i$	26
3.4. TABELA DE SOLUÇÕES.....	28
3.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	29
3.6. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR	30
3.7. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL COM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	31
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4. RESULTADOS	33
4.1. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS VARIAÇÕES NA $[Ca^{2+}]_i$	33
4.2. REGISTRO DO PH INTRACELULAR	38
4.3. VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULAR	41
4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	42
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1.GENTAMICINA

A gentamicina, que é o foco principal deste trabalho, é um antibiótico aminoglicosídeo que possui um largo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*), sendo sua utilização recomendada em casos mais graves. (BALAKUMAR, ROHILLA e THANGATHIRUPATHI).

Desde o desenvolvimento dos aminoglicosídeos, por volta de 1940, estes são preferencialmente utilizados na terapia antimicrobiana. A gentamicina foi descoberta em 1963 e continua sendo bastante utilizada, apesar da disponibilidade de outros aminoglicosídeos como a amicacina, netilmicina, canamicina, tobramicina e outros. Além de ter um baixo custo, a popularidade da gentamicina se deve ao fato de ser bastante eficaz, demonstrando uma baixa resistência antimicrobiana (SANTUCCI e KRIEGER, 2000). Nas bactérias, o aminoglicosídeo se liga ao RNA ribossomal e induz erro no processo de tradução e a inibição da síntese de proteínas, resultando na morte das bactérias (DAVIES e DAVIS, 1968; NOLLER, 1991). Porém, ocorrem restrições para sua utilização devido à nefrotoxicidade e ototoxicidade causadas pela gentamicina. A nefrotoxicidade é mais facilmente revertida após término do tratamento, devido à capacidade de proliferação das células tubulares renais.

No início da década de 60 ocorreu a explosão comercial do uso terapêutico da gentamicina. Cerca de 50% dos indivíduos que faziam uso deste antibiótico apresentavam insuficiência renal aguda (IRA). Desde que foi descoberto que a gentamicina é capaz de provocar diversos danos aos pacientes tratados, um grande número de trabalhos foi desenvolvido para tentar entender seus efeitos ototóxicos, nefrotóxicos e também em outros tipos celulares. Já ao final da década de 60 começaram a aparecer relatos baseados em estudos experimentais sobre os efeitos nefrotóxicos dos aminoglicosídeos (FALCO, SMITH e ARCIERI, 1969).

Na década de 80 já procurava-se saber a localização da gentamicina dentro das células afetadas e, também, as alterações enzimáticas causadas durante o tratamento. Morin *et al.* (1980) demonstraram que a gentamicina, comparativamente aos demais segmentos do néfron, se acumula de forma mais intensa no túbulo proximal de coelhos. Nestas células, promove diminuição da atividade de enzimas da borda em escova e dos lisossomos.

Coimbra e Lachat (1988) também demonstraram a ação do aminoglicosídeo no túbulo proximal, evidenciando que a albuminúria presente em ratos tratados com gentamicina estaria relacionada a uma mudança na carga das proteínas, de modo a interferir no processo de reabsorção tubular.

Jensen-Smith, Hallworth e Nichols (2012) demonstraram que a gentamicina, em células ciliadas da cóclea da orelha interna de camundongo, é capaz de rapidamente inibir o metabolismo mitocondrial, levando a lesão coclear e futura perda auditiva. Também trabalhando com células da orelha interna, Chen e Wang (2011) demonstraram que, em células dos canais semicirculares, o antibiótico afeta a função de percepção de alta frequência.

Francescato *et al.* (2012) trataram ratos com gentamicina e notaram um grande aumento na excreção de sódio e potássio, um aumento na creatinina plasmática e na concentração de uréia, um grande número de macrófagos e monócitos e também muitas lesões presentes no córtex renal. Todos são indícios de que a função renal fica prejudicada com o uso do aminoglicosídeo.

Segundo Shen, Chou e Chiu (2003), o antibiótico é capaz de interferir num processo celular regulador de volume: a regulação da diminuição do volume celular (RDV), em uma linhagem de células de câncer cervical humano. Este processo é acionado quando uma célula é exposta a um ambiente hipotônico e sofrendo, portanto, um estresse osmótico. A gentamicina, nestes casos, retarda a RDV por inibir a entrada de íons cálcio do ambiente extracelular através de canais de Ca^{2+} ativados por estiramento e, também, por inibir a atividade dos canais de íons Cl^- reguladores de volume (sendo ambos os processos necessários na RDV). Estes mesmos autores cultivaram células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), semelhantes às do ducto coletor, e verificaram que, quando estas são expostas a um antibiótico análogo a gentamicina, a estreptomicina, também ocorre uma diminuição na RDV, de forma semelhante às células de câncer cervical.

Entretanto, em condições normais, a gentamicina tem ação agonista sobre receptores sensíveis a cálcio (CaSR), (WARD, MCLARNON e RICCARDI, 2002), o que contribui para o processo de morte celular (MOESTRUP *et al.*, 1995; WEGIERSKI *et al.*, 2009), estando esses aspectos envolvidos no desenvolvimento da IRA. Atualmente, a nefrotoxicidade induzida pela gentamicina ocorre em cerca de 10 a 20% dos tratamentos, sendo que, a evolução da IRA (caracterizada pela depressão da taxa de filtração glomerular) normalmente se manifesta após 5 a 7 dias de tratamento (QUIROS *et al.*, 2011). Nos pacientes tratados por mais de 14 dias, a nefrotoxicidade chega a aparecer em cerca de 50% deles, resultando num aumento da morbidade durante e após o término do tratamento (MYRDAL e STEYGER, 2005).

1.2. CÉLULAS MDCK – C11

As células MDCK, derivadas do rim de cachorro normal (Cocker Spaniel) por Madin-Darby em 1958, estão entre as mais bem caracterizadas células do epitélio renal. Fazem parte de uma linhagem de células permanentes do néfron distal, mais especificamente do ducto coletor. São comumente utilizadas como modelo para estudos envolvendo polarização epitelial, formação e regulação de *tight junctions*, transporte transepitelial, mecanismos de infecção, propriedades e regulação de canais iônicos, etc. Apresentam, na membrana apical, mecanismos de transporte como trocador Na^+/H^+ , H^+ -ATPase, H^+/K^+ -ATPase e trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, bem como canais para Cl^- e K^+ . Na membrana basolateral foi verificada atividade do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, Na^+/K^+ -ATPase, trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, canais para K^+ e Ca^{2+} . A diferença de potencial transepitelial é de aproximadamente -50 mV (lúmen negativo) e a resistência está entre 200 e 4000 Ω/cm^2 (LANG e PAULMICH, 1995). São células capazes de secretar Cl^- e H^+ . As MDCK não representam uma população homogênea de células, pois já foram descritos vários clones, particularmente os subtipos C7 e C11. C7 são células baixas, poligonais, com espaços intercelulares pouco nítidos e núcleo visível. Apresentam uma alta resistência (>4000 Ω/cm^2), são secretoras de K^+ e têm

sensibilidade ao amiloride e à aldosterona. C11 são células altas, poligonais, com espaços intercelulares nítidos e núcleo invisível. Têm baixa resistência, em torno de $330 \Omega/\text{cm}^2$ (GEKLE *et al.*, 1994).

É possível relacionar estes dois tipos de células MDCK citados a dois tipos de células predominantes no ducto coletor. O ducto coletor possui células principais e intercalares. As principais, em maior número, são responsáveis pela reabsorção de íons Na^+ e secreção de íons K^+ . Já as células intercalares, as quais têm sua frequência diminuída à proporção que o túbulo desce a parte medular do rim, pode ser ainda de dois tipos, alfa e beta. As intercalares alfa possuem uma H^+ -ATPase na membrana luminal, tornando-as responsáveis pela secreção ativa eletrogênica de H^+ . Além disso, também são responsáveis pela reabsorção de K^+ através de uma H^+K^+ – ATPase. As do tipo beta caracterizam-se por secreção de íons bicarbonato (MELLO-AIRES, 2008). Deste modo, é possível relacionar o subtipo C7 com as células principais e o subtipo C11 com as células intercalares do ducto coletor.

1.3. O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA DOENÇA RENAL

A insuficiência renal é caracterizada por alterações das funções dos rins, nas quais esses órgãos são incapazes de eliminar as substâncias tóxicas do sangue de forma adequada. Além disso, a importante participação do rim no equilíbrio hidroeletrolítico e no equilíbrio ácido-base, pode também estar comprometida. As causas da insuficiência renal são inúmeras, onde algumas acarretam diminuição rápida da função renal (insuficiência renal aguda), enquanto outras acarretam diminuição lenta e gradual da função renal (insuficiência renal crônica). O termo insuficiência renal aguda (IRA) é normalmente utilizado para danos renais ocasionados por isquemia e por agentes nefrotóxicos (drogas como a gentamicina e venenos). A IRA abrange uma série de condições clínicas caracterizadas por retenção de compostos nitrogenados, associados com redução de volume urinário (SCHOR, BOIM e SANTOS, 1997).

Nos últimos anos, mais atenção tem sido dada à presença de processos inflamatórios em diversos tipos de lesão renal progressiva (NOLASCO *et al.*, 1987). A progressão da patogênese da doença renal levando à falência renal ainda é em parte desconhecida, mas é bem caracterizado o desenvolvimento de glomeruloescleroses, injúrias tubulointersticiais e acúmulo de matriz extracelular.

Apesar de fatores mecânicos como hipertrofia e hipertensão glomerular contribuírem na progressão da doença renal, lesões tubulares não podem ser simplesmente interpretadas como sequelas isquêmicas da esclerose glomerular. Há evidências crescentes de que células inflamatórias têm papel crítico na progressão da doença renal. A inflamação tubulointersticial promove um influxo e proliferação de células inflamatórias, as quais migram impulsionadas pela expressão quimiocinas e moléculas de adesão, produzidas por células tubulares que sofreram injúrio (Figura 1, modificada a partir de NORONHA, 2002). Estas células inflamatórias são capazes de produzir uma série de mediadores locais inflamatórios e ativar células tubulares e outras células intrínsecas renais. Mediadores derivados de linfócitos, como o interferon gama, aumentam a expressão de proteína MHC, o que permite às células tubulares atuarem como apresentadoras de antígenos. Além disso, o interferon gama é uma molécula capaz de ativar macrófagos (principais leucócitos encontrados no tecido renal lesionado), que por sua vez irão ativar a produção de uma série de fatores de crescimento, considerados importantes mediadores no processo de fibrogênese.

A fibrogênese, mediada por fibroblastos, é uma resposta ao dano no tecido renal e ao processo inflamatório. Na doença renal progressiva, a fibrose não pode ser contida. Pelo contrário, o processo se perpetua e é caracterizado por um persistente processo inflamatório, cicatrização tecidual e destruição da arquitetura original do rim. Os fibroblastos sintetizam uma variedade de componentes de matriz extracelular (RUIZ-ORTEGA e EGIDO, 1997). A superprodução de proteínas leva ao excessivo acúmulo de colágeno e à fibrose.

Um mediador local que participa na doença renal progressiva, a Angiotensina II, deve ser considerado. Além de seus efeitos hemodinâmicos, a Angiotensina II exerce sua ação em células que participam do processo inflamatório e da fibrose tecidual. Este mediador age como um fator de crescimento, aumentando a proliferação de fibroblastos e de células mesangiais e

estimulando síntese de matriz extracelular. A Angiotensina II é capaz ainda de estimular a proliferação de células T (NORONHA, FUJIHARA e ZATS, 2002).

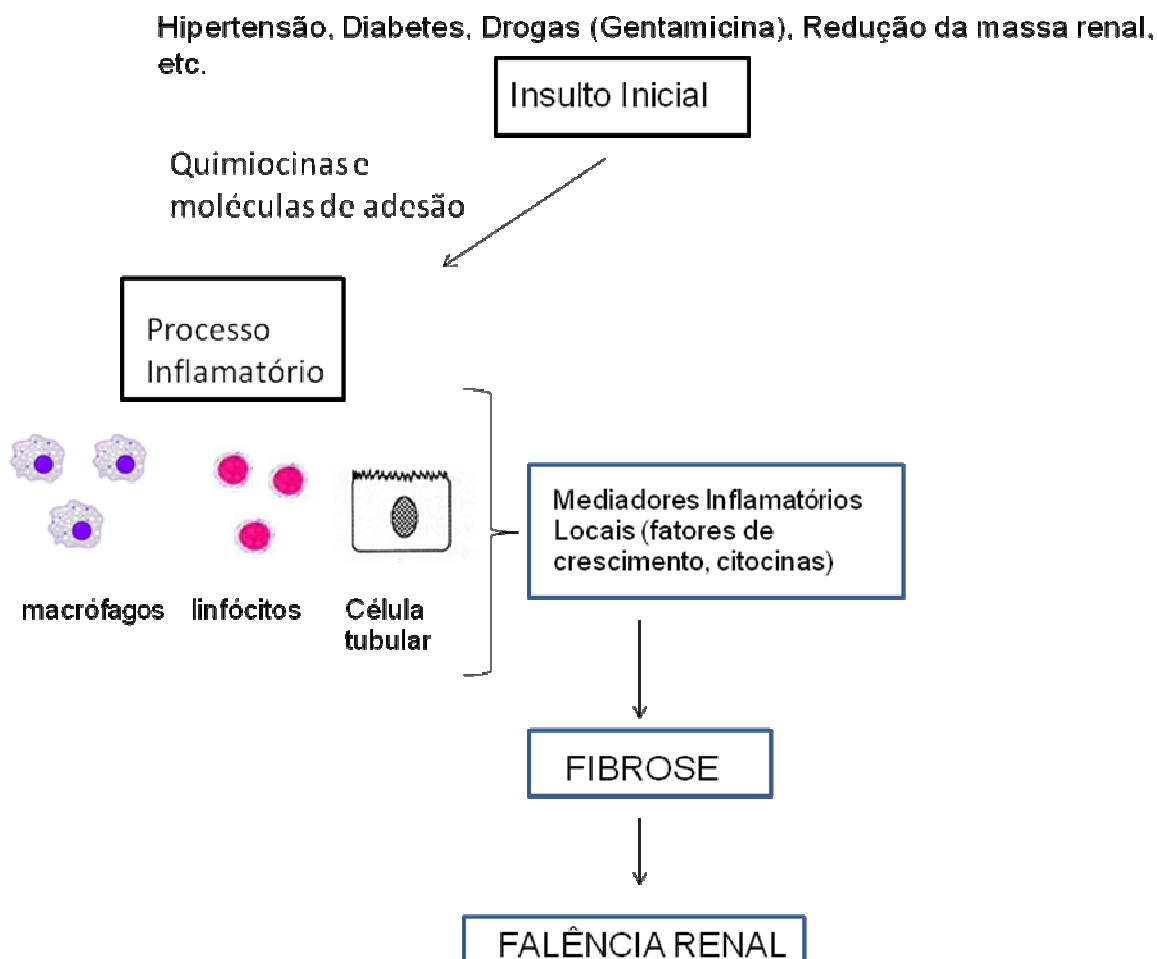


Figura 1: Progressão do processo inflamatório em células renais levando à falência renal. A partir de um insulto inicial, como o uso do antibiótico gentamicina, as células que sofreram o injúrio, principalmente tubulares, produzem quimiocinas e moléculas de adesão capazes de atrair células da resposta imune. Estas células (macrófagos e linfócitos), juntamente com as próprias células tubulares afetadas, produzem mediadores inflamatórios locais que acabam levando o tecido renal à fibrose e, conseqüentemente, à falência renal. Modificada a partir de Noronha, 2002.

1.4. EFEITOS DA GENTAMICINA NO GLOMÉRULO E EM CÉLULAS MESANGIAIS

A nefrotoxicidade da gentamicina pode ser associada tanto a danos glomerulares quanto tubulares, sendo mais frequente o aparecimento de danos tubulares proximais (SERVAIS *et al.*, 2005).

A gentamicina é normalmente administrada via endovenosa e não é metabolizada, sendo filtrada facilmente pelo glomérulo renal. O rim é um alvo comum para tóxicos xenobióticos devido à sua capacidade de extrair e concentrar substâncias e por receber uma grande parte do débito cardíaco (20%). Quando drogas como a gentamicina são administradas em animais experimentais, ocorre uma queda na taxa de filtração glomerular (TFG), aumento da resistência vascular renal e uma diminuição do coeficiente de ultrafiltração (K_f). O K_f é a medida do produto da condutividade hidráulica e da área de superfície dos capilares glomerulares. Não pode ser medido diretamente, mas é estimado experimentalmente pela divisão da taxa de filtração glomerular pela pressão líquida de filtração (GUYTON e HALL, 2006; MELLO-AIRES, 1999). A regulação do K_f é um fenômeno dinâmico que depende principalmente do grau de contração das células mesangiais intraglomerulares.

As células mesangiais, localizadas na parede vascular do centro do tufo glomerular, cercando as alças capilares, têm muitas das propriedades das células musculares lisas. Servem como suporte estrutural aos capilares glomerulares, secretam a matriz extracelular, apresentam atividade fagocítica (removendo macromoléculas do mesângio) e secretam prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias. Por estarem adjacentes aos capilares glomerulares e terem a capacidade de se contrair, as células mesangiais têm influência na TFG, regulando o fluxo sanguíneo que passa pelos capilares, ou alterando a área de superfície capilar (ou seja, alteram o K_f) – (BERNE e LEVY, 2009). A contração e o relaxamento das células mesangiais podem ser alterados tanto por substâncias endógenas como exógenas. Tem-se observado que substâncias nefrotóxicas como a gentamicina são capazes de alterar o K_f induzindo contração, proliferação e aumento da concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ nas células mesangiais. A proliferação pode ser interpretada como uma resposta de reparo ao dano causado pela gentamicina aos compartimentos mesangiais ou adjacentes a estes. Simultaneamente ao seu efeito proliferativo, a gentamicina também é capaz de causar a apoptose de células mesangiais, sem ocasionar, portanto, grandes mudanças do número de células glomerulares. A redução da superfície de ultrafiltração glomerular, induzida por contração glomerular, poderia ser uma

condizente explicação para o decréscimo da TFG após tratamento com antibióticos aminoglicosídeos.

Células mesangiais são capazes de expressar receptores sensíveis a cálcio, (CaSR). A gentamicina é capaz de estimular contração e proliferação em culturas primárias de células mesangiais a partir do aumento da $[Ca^{2+}]_i$. A habilidade de bloqueadores de canais de cálcio de inibir a contração e proliferação das células mesangiais, induzidas por aminoglicosídeos como a gentamicina, demonstra que este aumento do cálcio livre no citosol é necessário para ambos os processos ocorrerem nestas células. Agindo nos CaSR, os aminoglicosídeos induzem o mediador inositol 3-fosfato (*inositol triphosphate* - IP_3) a liberar cálcio do retículo endoplasmático, resultando em um acréscimo na $[Ca^{2+}]_i$. Além de aumentar a concentração de Ca^{2+} livre no citosol, a gentamicina induz nas células mesangiais um aumento na ativação, síntese e liberação de PAF (*Platet-activating Factor*) e de tromboxano A_2 , na produção de ROS (*Reactive Oxygen Species*), na síntese de óxido nítrico (ON), dentre outros mediadores intracelulares. (MARTÍNEZ-SALGADO, LÓPEZ-HERNÁNDEZ e LÓPEZ-NOVOA, 2007).

1.5.EFEITOS TUBULARES DA GENTAMICINA

1.5.1. Células Tubulares Proximais

O túbulo proximal é o local do néfron que primeiramente sofre alterações histológicas e estruturais causadas pela gentamicina e o maior local de acúmulo da droga. O efeito nefrotóxico do antibiótico leva à perda da integridade da borda em escova e evidente apoptose e necrose das células tubulares proximais (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005; MOESTRUP *et al.*, 1995). O acúmulo da gentamicina no túbulo proximal ocorre devido à existência de um complexo endocítico de membrana envolvendo as proteínas megalina e cubilina. Este receptor endocítico transporta moléculas de natureza catiônica presentes no

ultrafiltrado tubular para dentro das células tubulares (Figura 2, modificada a partir de MOESTRUP, 1995). Uma vez dentro das células, os aminoglicosídeos alteram a função de várias organelas e também processos que são cruciais para a viabilidade celular. O lisossomo é a organela onde a gentamicina mais se acumula, apesar de ter acesso a outros compartimentos celulares como o Complexo de Golgi, Retículo Endoplasmático (RE) e Citosol. (SERVAIS *et al.*, 2005).

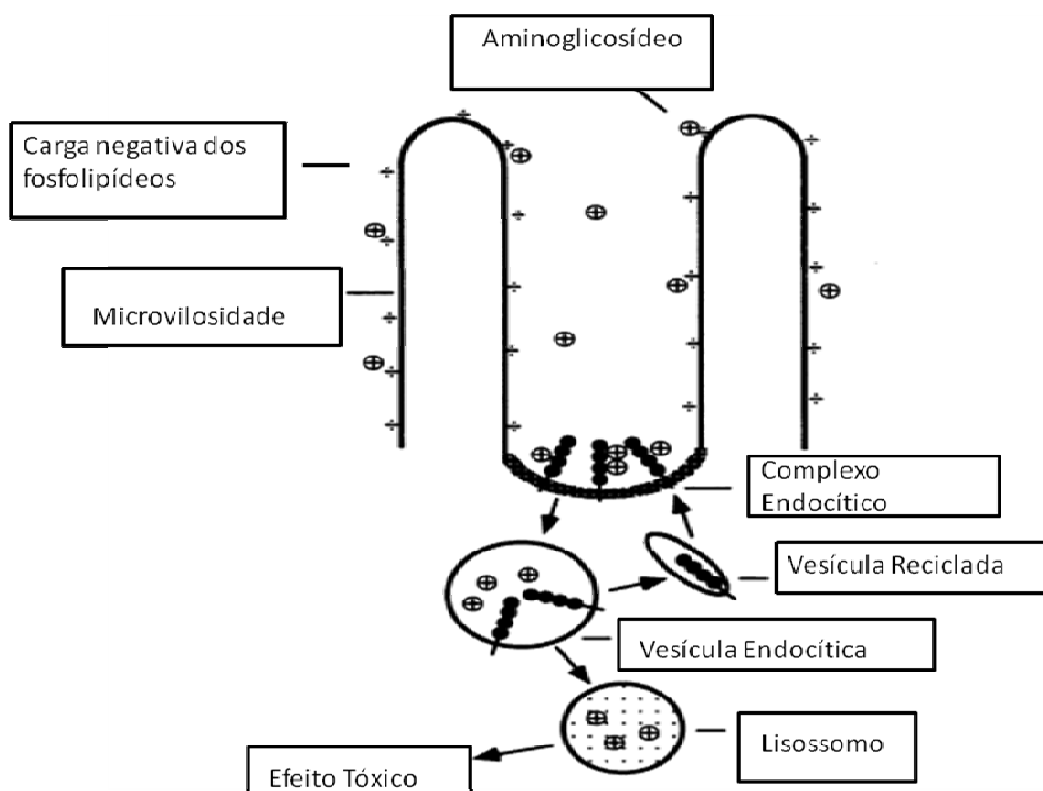


Figura 2: Endocitose de um aminoglicosídeo através de um Complexo Endocítico de Membrana, formado pelas proteínas megalina e cubilina. Modificada a partir de Moestrup, 1995.

1.5.2. Apoptose de células tubulares

Dentre as várias organelas subcelulares potencialmente envolvidas na apoptose, lisossomos e mitocôndrias estão entre as principais capazes de enviar sinais de morte celular, através da ativação de sensores de estresse celular específicos (FERRI e KROEMER, 2001).

Servais *et al.* (2005) demonstraram que em células tubulares proximais LLC-PK1, expostas à gentamicina, o início da apoptose é precedido por desestabilização da membrana lisossomal. A ativação do “caminho lisossomal para a apoptose” – terminologia bem aceita para descrever o mecanismo que foi primeiramente identificado em situações patológicas (GUICCIARDI, LEIST e GORES, 2004) - consiste na ruptura da membrana lisossomal e liberação de hidrolases ácidas. Desta forma, o acúmulo da gentamicina nos lisossomos pode ativar morte celular programada.

A gentamicina também é capaz de se acumular no Retículo Endoplasmático, causando uma situação de estresse (QUIROS *et al.*, 2011). Distúrbios das funções normais do RE levam a uma resposta ao estresse celular evolutivamente conservada, a Resposta às Proteínas Desdobradas (UPR – *Unfolded Protein Response*). O intuito inicial da UPR é adaptar a célula à mudança do ambiente e reestabelecer as funções do RE normalmente. Este mecanismo de adaptação envolve a expressão de determinados genes que aumentam a capacidade das proteínas no RE de se dobrarem e, também, promove degradação de proteínas não-dobradas. Quando a tentativa de adaptação falha, sinais de alarme desencadeados pelo RE ativam o NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*), um fator transcricional que induz a expressão de genes envolvidos na defesa celular. O excessivo e prolongado estresse do RE pode levar a célula à apoptose, representando o último mecanismo da UPR para eliminar células anormais do organismo. A apoptose celular via RE, induzida pela persistente ativação da UPR, pode estar envolvida com a liberação de Ca^{2+} pela Ca^{2+} /ATPase, na membrana do RE (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005). O aumento do Ca^{2+} citosólico ativa a via das caspases - proteases que induzem à fragmentação do DNA - levando então a célula à apoptose.

Além de seus efeitos tóxicos via endocitose, a gentamicina é capaz de ativar CaSR presente na membrana apical da célula tubular, o qual tem sido associado com morte celular tubular (QUIROS *et al.*, 2011). Segundo Ward *et al.* (2005), agonistas de CaSR, como o gadolínio e a gentamicina, ativam Fosfolipase C (PLC) em células tubulares proximais, resultando na formação do IP_3 e consequente liberação de Ca^{2+} do RE.

O Ca^{2+} é uma molécula de sinalização muito versátil que controla inúmeras funções durante a vida e a morte das células. Estudos recentes têm enfatizado o papel central do Ca^{2+} na regulação da morte celular programada. O aumento do Ca^{2+} citosólico durante a morte celular pode surgir por hiperativação de canais de cátion e por liberação de cálcio do RE. Segundo Wegierski, *et al.* (2009), uma significativa fração de Ca^{2+} liberada pelo RE é sequestrada pela mitocôndria, a qual fica localizada estrategicamente perto dos canais liberadores de Ca^{2+} do RE. Durante a morte celular, sinais enviados pelo elevado Ca^{2+} mitocondrial resultam na despolarização da membrana da mitocôndria e liberação do citocromo c. Sinais de alterações mitocondrias causados pela gentamicina têm sido associados com esta liberação do citocromo c pelas mitocôndrias. O citocromo c é uma proteína associada à membrana interna da mitocôndria e é componente essencial na cadeia transportadora de elétrons. Uma vez liberado, o citocromo c promove a ativação das caspases envolvidas na fragmentação do DNA e de proteínas do citoesqueleto. (COOPER, 2002)

Já segundo Quiros *et al.* (2011), a liberação de Ca^{2+} pelo RE primeiramente ativa a calpaína (protease dependente de cálcio), a qual ativa a caspase 12 (possivelmente caspase 4 em humanos) e esta sim promove a liberação do citocromo c pela mitocôndria. Além da apoptose via citocromo c, esses autores propõem que a liberação de Ca^{2+} pelo RE também resulta na ativação de uma proteína quinase ativada por estresse celular, a *cJun N-kinase* (JNK). Essa proteína quinase também é capaz de induzir apoptose, porém de forma direta, sem a participação da mitocôndria.

1.5.3. Células do Néfron Distal

No rim, as células tubulares proximais são as mais sensíveis à citotoxicidade induzida por aminoglicosídeo, pois endocitam e acumulam a droga nas organelas intracelulares. Por outro lado, as células do néfron distal são mais resistentes ao aminoglicosídeo, possivelmente por não terem uma característica endocítica tão evidente quanto a das células proximais.

Existem poucos achados a respeito da ação de aminoglicosídeos sobre células distais. Myrdal e Steyger (2005) caracterizaram e validaram um mecanismo independente de endocitose, pelo qual a gentamicina parece atravessar a membrana plasmática diretamente para o citoplasma e para o núcleo de células MDCK. Estes autores determinaram a participação de um receptor catiônico de membrana, o TRPV 1 - (*Transient Receptor Potential vanilloid 1*), pertencente a família dos receptores TRP (*Transient Receptor Potential*), como mediador da entrada da gentamicina. O uso de moduladores da atividade deste receptor influenciou diretamente na captação da gentamicina. Agonistas do TRPV1, baixas concentrações de cálcio no meio extracelular e pH extracelular ácido, rapidamente elevaram a captação de gentamicina pelas células, demonstrando que o TRPV 1 participa da captação do antibiótico nas células MDCK.

Existem cerca de 20 membros descritos na família dos receptores de membrana TRP, que atuam tanto como receptor quanto como canal iônico. São canais de cátion não-seletivos, permeáveis a Ca^{2+} , sendo a maioria não-dependente de voltagem (BENHAM, DAVIS e RANDALL, 2002). Estão envolvidos na homeostase do Ca^{2+} , especialmente em células que não são ativadas eletricamente (LAUNAY *et al.*, 2002). Os TRPs parecem atuar como mediadores de estímulos ambientais tais como calor, frio, acidez, odores, osmolaridade, contato, gosto, fluxo de fluidos e sons (KARASAWA *et al.*, 2008).

Um grande diferencial entre as células tubulares proximais e as distais, é que as do néfron distal possuem o receptor TRPV 4. O TRPV 4 é um receptor mecanossensível que é responsivo à pressão osmótica sistêmica induzida pelo aumento do volume celular, em meio hipotônico. No rim, o TRPV 4 é somente expresso nos segmentos do néfron impermeáveis à água e onde é esperado a geração de um gradiente osmótico. O TRPV 4 pode mediar a captação dos aminoglicosídeos em diferentes linhagens de células renais, sendo sua existência já confirmada nas células MDCK. A partir de cultura de células primárias do rim de camundongo, Karasawa *et al.* (2008) imortalizaram 3 diferentes tipos celulares, sendo um deles semelhante ao néfron distal, nomeadas KDT3. Estes autores demonstraram nestas células uma correlação entre diferentes concentrações de cálcio no meio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$), ativação do receptor TRPV 4 e captação da

gentamicina. Na ausência de Ca^{2+}_o , ocorre um aumento significativo da captação da gentamicina e maior corrente passando pelo TRPV 4, comparando com a situação controle (concentrações fisiológicas de cálcio). Já um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ acima da fisiológica, diminui bastante a captação da gentamicina e também a corrente no TRPV 4. Dessa forma, mais um mecanismo independente de endocitose estaria influenciando na captação da gentamicina em células do néfron distal.

1.5.4. Regulação do pH e o envolvimento do Ca^{2+}_i

A regulação tanto do pH dos líquidos corporais quanto do pH intracelular (pH_i) é essencial para a homeostase do meio interno, pois pequenas variações podem afetar muitas funções metabólicas. Nesse sentido, os rins e os mecanismos de acidificação urinária desempenham papel central na regulação do pH. Já foi demonstrado que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está envolvida em processos de recuperação do pH_i de células MDCK, após pulso ácido induzido por NH_4Cl , mediada pelo trocador Na^+/H^+ (OLIVEIRA-SOUZA e MELLO-AIRES, 2001).

Tendo em vista o já conhecido envolvimento do Ca^{2+} na ação nefrotóxica da gentamicina e no processo de apoptose e, também, a importante participação das células intercalares do ducto coletor no processo de acidificação urinária, a proposta deste trabalho foi a de estabelecer relações entre esses aspectos, ou seja, cálcio intracelular, regulação do pH intracelular e apoptose, usando MDCK C11 como modelo experimental.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Este estudo teve por objetivo determinar a ação da gentamicina sobre cultura de células semelhantes às do ducto coletor renal (MDCK C11), com a finalidade de se estabelecer os efeitos deste antibiótico aminoglicosídeo sobre: a) concentrações de cálcio intracelular; b) pH intracelular; c) viabilidade celular; d) citotoxicidade celular; e) morfologia celular.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigou-se mais especificamente, nas células MDCK C11:

- $[Ca^{2+}]_i$ em situação controle (sem gentamicina) e em células incubadas com gentamicina;
- Se o possível aumento do $[Ca^{2+}]_i$ está relacionado ao aumento da entrada de Ca^{2+} do meio extracelular ou à liberação de estoques intracelulares de Ca^{2+} ;
- Possíveis modificações do pH intracelular provocados pela exposição à gentamicina;
- Viabilidade celular, através de modificações no processo de endocitose da célula após exposição à gentamicina, com utilização do Método do Vermelho Neutro;
- Citotoxicidade celular, através de modificações do metabolismo mitocondrial após exposição à gentamicina, com utilização do Método do MTT;
- Alterações morfológicas das células provocadas pela gentamicina, com utilização de Microscopia Eletrônica de Varredura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CULTIVO CELULAR DO SUBTIPO C11 DE CÉLULAS MDCK

O subtipo (clones) C11 das células MDCK foi cultivado em *Minimum Essential Medium* (MEM) - Gibco, que contém: sais de Earle, glutamina e aminoácidos essenciais, com adição de NaHCO_3 2g/l, penicilina e estreptomicina (10000 U/ml). O meio foi suplementado com soro bovino fetal (SBF), Gibco, a 10%. As células foram cultivadas em garrafas plásticas a uma densidade de $10^4/\text{cm}^2$, acondicionadas em estufa CO_2 (5%) - Sanyo, a 37° C. Após observação da confluência (cerca de 72h após a realização da cultura), as células foram tratadas com Tripsina - EDTA (Gibco™, Grand Sland, NY), centrifugadas, ressuspensas em meio acrescido de soro bovino fetal e semeadas em placas ou lamínulas de acordo com o protocolo a ser realizado. O número de passagens utilizadas foi de 70 a 95. As MDCK C11 foram cedidas pelo Dr. H. Oberleither, do Departamento de Fisiologia da Universidade de Münster, Alemanha.

3.2. REGISTRO DO pH INTRACELULAR

O pH intracelular foi mensurado a partir da utilização do *probe* fluorescente BCECF-AM (2',7'- biscarboxietil-5,6-carboxifluoresceína), na forma acetilometil éster, que não tem propriedades fluorescentes, à qual a membrana é permeável. O contato com as esterases intracelulares promove a desesterificação do BCECF, o que o torna fluorescente e impermeante à membrana. O pH_i foi determinado a partir da excitação do BCECF, de forma alternada, a 490 nm (comprimento de onda no qual a fluorescência é sensível ao pH_i) e 440 nm (ponto isobéstico), insensível às variações do pH. A emissão da fluorescência é medida a 530 nm, a cada 10 segundos. O epitélio foi incubado em solução controle contendo 10μM de BCECF-AM (*Molecular Probe*) por 20 minutos, em condições

controladas de temperatura, umidade e CO₂. As áreas de interesse do epitélio celular foram delimitadas (aumento de 20 vezes) e as leituras foram feitas no microscópio invertido de fluorescência Zeiss, modelo Axio Observer, acoplado ao software para fisiologia *AxioVision 4.8.1*. Em cada preparação, lamínula de 20x20 mm contendo monocamada confluenta de células, foi colocada numa câmara termostatzada a 37°C que foi montada na platina do microscópio invertido. O epitélio foi então incubado com diferentes soluções a 37°C e o pH previamente ajustado para 7,4.

As razões obtidas ao longo de cada experimento foram convertidas em valores de pH através de regressão linear, a partir da Curva de Calibração com Nigericina (item 3.3). Foram seguidos os seguintes protocolos:

1. Exposição à Solução 0Na⁺: após o registro do pH_i basal com solução controle (Solução 1 do item 3.5) por aproximadamente 2 minutos (tempo necessário para estabilização), as células foram então lavadas com solução 0Na⁺ (Solução 2) e em seguida expostas a essa mesma solução. A excitação foi feita imediatamente à incubação das células com solução 0Na⁺, por um período de 2 minutos;
2. Exposição à Solução Sulfato de Gentamicina 0,1mM (Santa Cruz): seguiu-se o mesmo protocolo anterior, porém acrescentamos Sulfato de Gentamicina 0,1mM após registro do pH_i basal.

3.2.1. Registro fluorescente de vesículas ácidas

Utilizando os mesmos protocolos dos itens 1 e 2 acima, foi registrada a variação da fluorescência utilizando-se como sonda fluorescente Acridine Orange 10μM.

3.2.2. Curva padrão com nigericina (curva de calibração)

A curva padrão foi obtida a partir de soluções de Nigericina 10 μ M (Santa Cruz) com alto K⁺ a pH 6,0 – 6,5 – 7,0 – 7,5. A Nigericina permite a permuta livre de H⁺ e K⁺ na membrana celular e equilibra o pH extracelular com o pH intracelular. Após incubação com BCECF e registro do pH basal, a monocamada foi exposta às soluções de Nigericina, sempre iniciando-se pelo pH mais alto. Os valores obtidos para a razão de fluorescência I_{495} / I_{440} foram representados em função do pH_o e utilizados para calcular o pH_i nos experimentos a partir da equação: **pHi = [(I_{495} / I_{440})_E - (I_{495} / I_{440})_C] * Slope da curva de calibração + pH_C**, onde (I_{495} / I_{440})_E e (I_{495} / I_{440})_C são as razões de fluorescência no experimento e em um padrão respectivamente, e pH_C é o pH extracelular padrão que deu origem à razão (I_{495} / I_{440})_C. A curva de nigericina está representada na Figura 3:

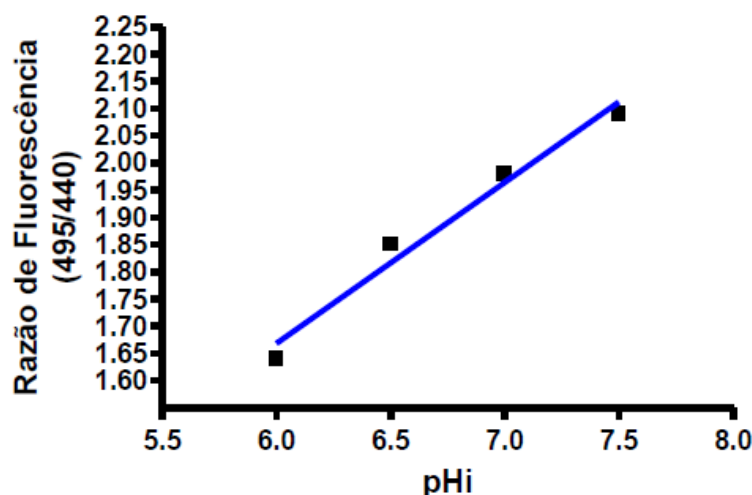


Figura 3: Regressão Linear da Curva Padrão com Nigericina

Nota: Apresenta as razões de fluorescência (495/440) obtidas utilizando-se BCECF 10 μ M como sonda intracelular em monocamadas confluentes de células MDCK C11.

3.3. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS VARIAÇÕES NA $[Ca^{2+}]_i$

As células MDCK cultivadas em lamínulas de vidro foram previamente incubadas por 30 minutos com FLUO – 4 10 μ M (*Molecular Probes*), em condições controladas de temperatura, umidade e CO₂. Mudanças qualitativas na [Ca²⁺]_i das culturas celulares foram monitoradas pela emissão da intensidade fluorescente do marcador FLUO – 4. O espectro de excitação para este marcador fluorescente é de 480nm, enquanto a fluorescência é medida a 520nm a cada 1 segundo. O *probe* FLUO-4 apresenta um incremento da intensidade fluorescente na faixa verde (520nm) após sua ligação com o Ca²⁺. Por se tratar de um *probe* com uma faixa de excitação/emissão simples, as variações da intensidade basal de fluorescência não podem ser corrigidas e os resultados devem ser expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UFA). As modificações na intensidade fluorescente resultantes durante os experimentos foram expressas como porcentagem em relação à intensidade de fluorescência no período basal (período de registro com solução controle).

Após os 30 minutos de incubação, a lamínula contendo monocamada de epitélio celular foi colocada na câmara termostatzada a 37°C e o epitélio foi lavado com solução controle para remover os restos de *probe* desesterificados. Com a estabilização do registro da solução controle (cerca de 2 minutos), cada lamínula com o epitélio foi exposta a diferentes soluções, com tempo de registro da intensidade fluorescente de aproximadamente 1 minuto. Os diferentes protocolos estão descritos a seguir:

1. Sulfato de Gentamicina 0,1mM, registrando-se a intensidade fluorescente após 10 minutos de exposição ao antibiótico (G10), 20 minutos de exposição ao antibiótico (G20) e por fim, foi feito o registro de cálcio com 30 minutos de exposição ao antibiótico (G30);
2. Agonista de CaSR - Gadolínio (Gd³⁺) 0,3mM, seguindo os mesmos tempos de exposição do protocolo 1 (Gd 10, Gd 20, Gd 30);
3. G10, seguida de quelante de cálcio extracelular - EGTA 1.8mM (*Ethylene Glycol – bis (β -Aminoethyl Ether) – N,N,N',N' – Tetra-acetic acid*) – Ambresco, diluído em solução Sulfato de Gentamicina 0,1mM, registrando-se a intensidade fluorescente de forma imediata (assim que o epitélio entrou em contato com a solução – Egta imediato); após 5

minutos de contato do epitélio com a solução – Egta 5 e, por fim, registrando-se após 10 minutos – Egta 10;

4. G10, seguida de EGTA 10 minutos (Egta 10), seguida de registro com 20 minutos de exposição a essa solução (Egta 20) e, por último, com 30 minutos de exposição (Egta 30);
5. G10, seguida de quelante de cálcio intracelular - Bapta - AM 50 μ M (Santa Cruz), diluído em solução Sulfato de Gentamicina 0,1mM, registrando-se a intensidade fluorescente com 10 minutos de exposição a essa solução;
6. G10, seguida de quelante dos estoques intracelulares de cálcio - Tapsigargina 0,1 μ M (SIGMA), diluído em solução Sulfato de Gentamicina 0,1Mm, registrando-se a intensidade fluorescente com 10 minutos de exposição a essa solução.

3.4. TABELA DE SOLUÇÕES

	Solução 1: Controle	Solução 2: 0Na ⁺	Solução 3: Nigericina
NaCl (mM)	135		20
KCl (mM)	5	5	130
NaH ₂ PO ₄ (mM)	1		
Na ₂ SO ₄ (mM)	1		
CaCl ₂ (mM)	1.8	1.8	1
Hepes (mM)	10	10	5
MgCl ₂ (mM)	1	1	1
NMDG (mM)		137	
NH ₄ Cl (mM)			
Glicose (mM)	10	10	10

Tabela 1: Tabela de soluções

Nota: Soluções utilizadas para realização dos experimentos de registro do pH intracelular, para obtenção da curva de calibração e para avaliação qualitativa das variações na [Ca²⁺]_i. NMDG: N-metil-D-glucamina

3.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O método de Vermelho Neutro foi realizado de acordo com as metodologias descritas por Borenfreund e Puener, 1984; Fotakis e Timbrell, 2006; Chaim *et al.*, 2006. Este método consiste em avaliar a capacidade das células endocitarem, por fase fluida, o corante vermelho neutro. Para tanto, há uma correlação direta da integridade da membrana plasmática, somente presente em células viáveis, com a maior captação deste corante. Após a endocitose, o corante fica acumulado no interior das células, e com uma solução de eluição, o corante diluído pode ser quantificado por medida de absorbância.

Depois de obtida a confluência das MDCK C11, após serem mantidas em cultivo celular conforme item 3.1, estas foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas 8.000 células por poço, em placas de 96 poços (TPP). As células foram mantidas em cultivo celular por 24 horas e depois expostas à gentamicina, na concentração de 0,1mM, por períodos de 24 horas, 3 horas, 1 hora e 30 minutos. Após as células terem sido expostas ao antibiótico por 24 horas e por 3 horas, estas foram incubadas por 2 horas, com 20µL de uma solução mãe de vermelho neutro de 1100mg/mL em PBS (*Phosphato Buffer Solution*, MERCK), diluídos em 200µL do meio de cultivo MEM, com volume final de 20µL em cada poço, obtendo assim uma concentração final de 100mg/mL de vermelho neutro (SIGMA, N6634). As células tratadas com o antibiótico por 1 hora e por 30 minutos foram incubadas com 100mg/mL de vermelho neutro por 1 hora e 30 minutos respectivamente. Após a incubação, o sobrenadante foi aspirado e desprezado e foi adicionado sobre as células 100µL de uma solução eluente (Etanol / Ácido Acético Glacial; 50%/1% em água ultrapura). Homogeneizou-se lentamente e posteriormente a placa foi submetida à leitura da absorbância em um comprimento de onda de 550nm, em leitor de microplacas (BIOTEK, EPOCH). Foi empregada a função escaneamento de poços, onde se divide cada poço em 16 partes e realiza-se a leitura 8 vezes em cada ponto, finalizando com a média da absorbância de todos os pontos analisados. Com esta forma de leitura pode-se ter a certeza da mensuração de toda a superfície de cada poço.

3.6. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR

O método do MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* - SIGMA M5655) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mosmann, 1983; Reilly *et al.*, 1998; Fotakis e Timbrell, 2006. O MTT tem o seguinte princípio: a partir do sal de tetrazólio, o qual é solúvel em água, este pode ser convertido em um cristal de formazan através da clivagem do anel de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase, a qual está presente no interior das mitocôndrias. O cristal de formazan é insolúvel em água e impermeável à membrana das células, se acumulando nas células saudáveis, podendo ser mensurado através da absorbância num comprimento de onda a 570nm. Desta forma foi mensurado o metabolismo mitocondrial, ou seja, de forma indireta, um possível mecanismo de citotoxicidade celular.

Depois de obtida a confluência das MDCK C11, após serem mantidas em cultivo celular conforme item 3.1, estas foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas 8.000 células por poço em placas de 96 poços (TPP). As células foram mantidas em cultivo celular por 24 horas e após este período expostas à gentamicina, na concentração de 0,1mM, por períodos de 24 horas, 3 horas, 1 hora e 30 minutos. Após as células serem expostas à gentamicina por 24 horas e por 3 horas, estas foram incubadas por 3 horas com 20µL da solução mãe de MTT 5mg/mL, sendo diluídos em 200µL do meio MEM, finalizando uma concentração 0,45mg/mL. Os tratamentos com gentamicina por 1 hora e 30 minutos foram incubados com 0,45mg/mL de MTT por 1 hora e 30 minutos, respectivamente. A seguir, o sobrenadante de MTT foi desprezado, retirou-se todo o líquido da placa, e os cristais de formazan formados no interior das células, pela metabolização do MTT pelas mitocôndrias, foram dissolvidos em 100µL de DMSO (*Dimethyl-Sulfoxide* - MERCK). Homogeneizou-se lentamente até a completa dissolução e posterior leitura da absorbância em leitor de microplacas (BIOTEK, EPOCH).

3.7. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL COM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Células MDCK C11, após serem mantidas em cultivo celular conforme item 3.1, foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e plaquedadas 30.000 células por poço, em placas de 24 poços (TPP), sobre lamínulas circulares de 13mm. Nas placas, as células foram mantidas em cultivo celular por três dias. Posteriormente as células foram expostas a gentamicina 0,1mM, com um tempo de tratamento de 24 horas, 3 horas, 1 hora e 30 minutos. Após os diferentes tempos de tratamento, as células foram lavadas quatro vezes em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4 a 4°C. A seguir, as células foram fixadas em solução de Karnovski (glutaraldeído 2,0%, paraformaldeído 4%, CaCl_2 1mM em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4) por 1 hora e lavadas em tampão cacodilato 3 vezes. Posteriormente foram pós-fixadas (Tetróxido de Ósmio 1%, em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4) por 1 hora à temperatura ambiente e depois as células foram novamente lavadas em tampão cacodilato 0,15M, pH 7,4. As MDCK C11 foram então desidratadas por concentrações crescentes de etanol (MERCK) (30%, 50%, 70%, 90%, duas vezes 100%), por um período de 10 minutos em cada concentração. Por fim, as células foram submetidas ao ponto crítico no aparelho CPD 030 - Balzers, metalizadas com ouro no aparelho SCD 030 - Balzers, e foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6360 – LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad InStat 3.10 (*GraphPad Software*, San Diego, California - EUA). O critério de significância estatística se obteve com valores de $p < 0.05$. Os resultados estão apresentados na forma de valores médios com erro padrão (EP). Para as análises entre dois

grupos foi utilizado o teste *t* de *student* para amostras pareadas. Para análises com mais de dois grupos foi feita análise de variância de uma via, seguida do teste de *Student-Newman-Keulls* quando aquela análise era estatisticamente significativa.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS VARIAÇÕES NA $[Ca^{2+}]_i$

As células MDCK C11 apresentam receptores sensíveis a cálcio (CaSR) e canais para cátion do tipo TRPV (BLANKENSHIP *et al.*, 2001; MYRDAL e STEYGER, 2005; KARASAWA *et al.*, 2008). São células semelhantes às intercalares do ducto coletor renal, capazes de secretar Cl^- e H^+ , interferindo de maneira efetiva na acidificação urinária (LANG e PAULMICH, 1995), o que contribui sobremaneira para a manutenção do equilíbrio ácido-base dos organismos.

Nestes experimentos, células expostas à solução 0,1 mM de sulfato de gentamicina por 10 minutos (G10) apresentaram aumento de $17,3 \pm 3,8\%$ da intensidade fluorescente na presença de FLUO-4, o que indica aumento na $[Ca^{2+}]_i$. Este aumento chegou a $30,3 \pm 4,1\%$ após 20 minutos (G20), sustentado após 30 minutos (G30), onde a diferença em relação aos registros basais (C) é de $38,1 \pm 5,0\%$ (Figura 4). Um experimento individual com gentamicina demonstra o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ ao longo do tempo (Figura 5). Quando as células foram expostas à solução contendo gadolínio 0,3mM, um agonista do CaSR, a intensidade fluorescente aumenta em $7,9 \pm 1,9\%$, $11,9 \pm 1,9\%$ e $16,13 \pm 1,6\%$, em 10(Gd10), 20(Gd20) e 30 minutos (Gd30), respectivamente, sendo que estes valores são significativamente menores que os obtidos para gentamicina, conforme mostra a Figura 4.

Aumento na $[Ca^{2+}]_i$ depende da presença de cálcio no meio extracelular, da estimulação de receptores e canais que promovam a entrada de cálcio no meio intracelular e de vias de sinalização intracelular que promovam a liberação de cálcio do retículo endoplasmático. Portanto, se a gentamicina promove aumento da $[Ca^{2+}]_i$, seria através da estimulação de alguma destas vias, direta ou indiretamente. Ainda na Figura 4 é possível observar que na ausência de cálcio extracelular a partir da adição de EGTA ao meio contendo gentamicina (Egta 10), a intensidade fluorescente foi significativamente menor que a observada para

gentamicina somente (G10), com valores 7,7% menores que o basal (C), onde a concentração de cálcio é de 1,8mM. Nota-se que a ausência de cálcio promoveu uma diminuição gradativa da $[Ca^{2+}]_i$ ao longo do tempo, uma vez que os valores médios chegaram a ser 14,8% menores do que o basal(C). Expondo células MDCK C11 por 10 minutos à solução de gentamicina contendo Bapta, um quelante do cálcio intracelular, a intensidade fluorescente emitida pelo FLUO-4 diminuiu a valores próximos do basal ($96,18 \pm 1,03\%$), como mostra a Figura 6. A depleção dos estoques de cálcio, a partir da utilização de tapsigargina, por 10 minutos nas preparações, inibiu a ação da gentamicina mas não totalmente, uma vez que apresentaram valores $5,11 \pm 0,22\%$ maiores que o basal (C), significativamente (Figura 6).

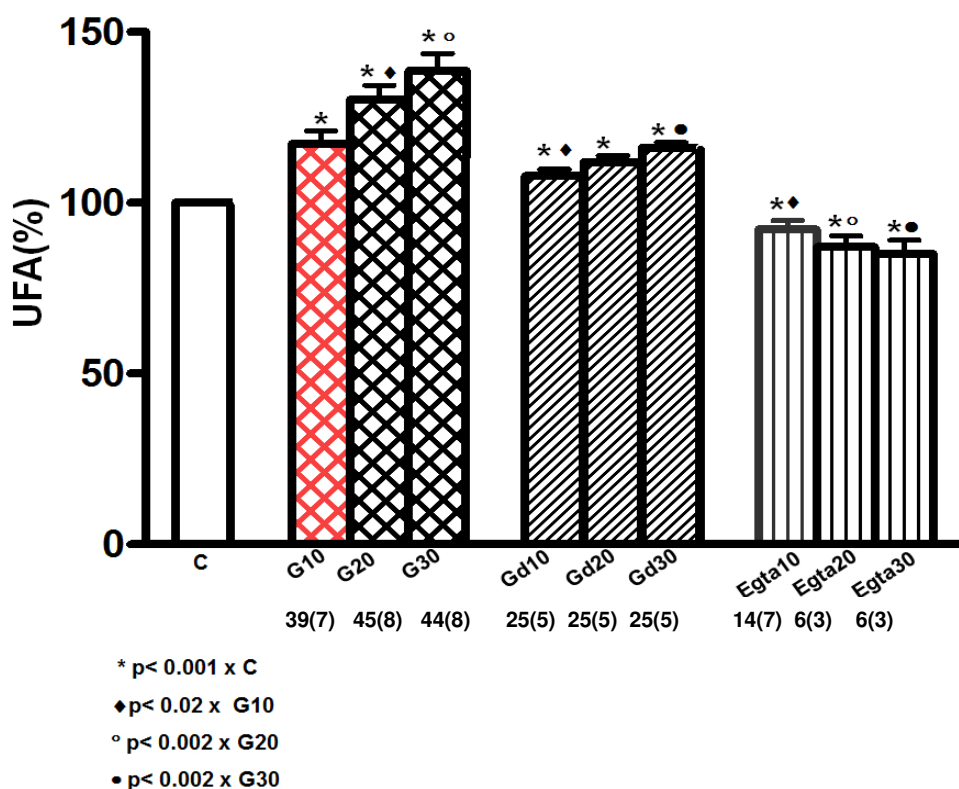


Figura 4: Variação na $[Ca^{2+}]_i$ com gentamicina, gadolínio e EGTA

Nota: Valores médios dos percentuais de variação na fluorescência (UFA%) emitida após excitação com FLUO-4, que indicam variações na $[Ca^{2+}]_i$ comparados a uma média hipotética (C=Controle 100%). G10, G20 e G30 correspondem ao percentual de variação em células incubadas com sulfato de gentamicina 0,1 mM, por 10, 20 e 30 minutos. Em Gd10, Gd20, e Gd30 a incubação foi com gadolínio 0,3mM, sem adição de gentamicina. Egta 10 20 e 30 indicam as variações obtidas quando da presença de EGTA na solução contendo 0.1 mM de sulfato de gentamicina.

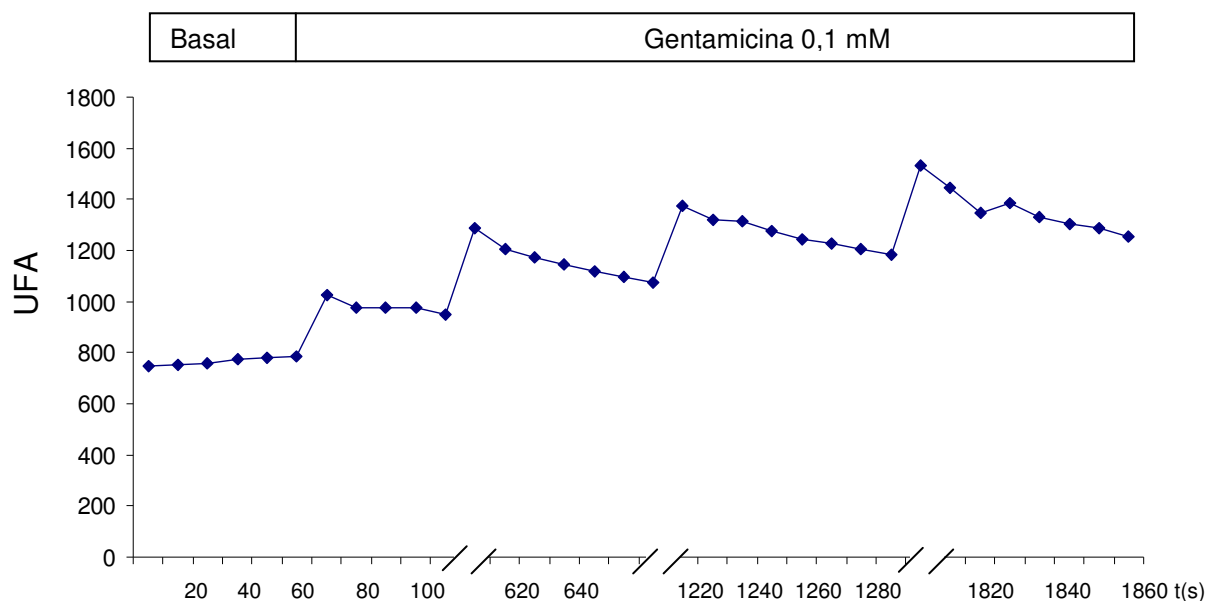


Figura 5: Variação na $[Ca^{2+}]_i$ com gentamicina

Nota: Registro de intensidade fluorescente emitida após incubação com FLUO-4, correspondente às variações na $[Ca^{2+}]_i$. Após o registro basal as células foram lavadas com solução contendo 0,1mM de gentamicina e imediatamente excitadas. A cada pausa de 10 minutos, nova excitação do fluoróforo foi registrada, completando 30 minutos de incubação com gentamicina.

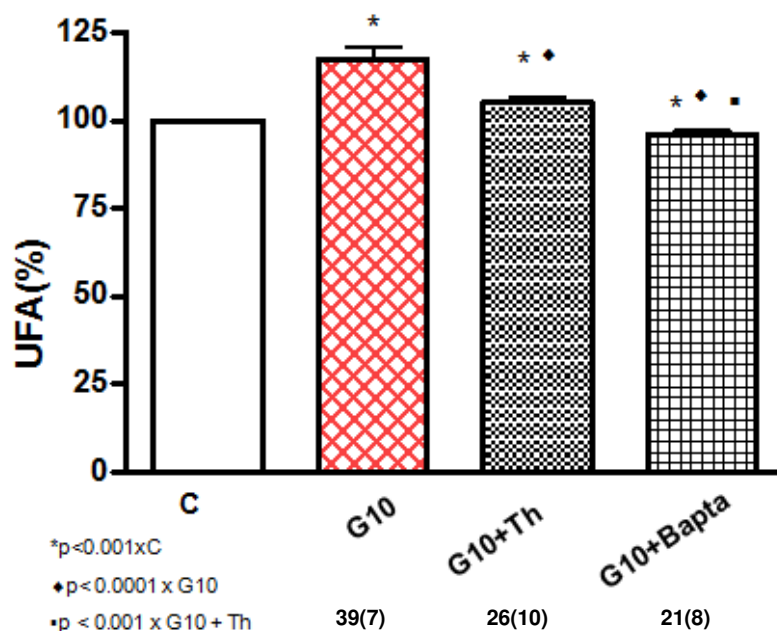


Figura 6: Variação na $[Ca^{2+}]_i$ com tapsigargina e bapta

Nota: Valores médios dos percentuais de variação na fluorescência (UFA%) emitida após excitação com FLUO-4, que indicam variações na $[Ca^{2+}]_i$, comparados a uma média hipotética (C=Controle 100%). G10 corresponde ao percentual de variação em células incubadas com sulfato de gentamicina 0,1 mM, por 10 minutos. Em Gd10+Th foi adicionado 0,1μM de tapsigargina por 10 minutos e em G10 + Bapta foi adicionado 50μM de Bapta por 10 minutos.

Myrdal e Steyger (2005) e Karasawa *et al.* (2008) demonstraram que diferentes $[Ca^{2+}]_o$ modulam a captação da gentamicina em células MDCK. Segundo estes autores, quanto maior $[Ca^{2+}]_o$, menor é a captação da gentamicina, o que é compreensível já que o cálcio poderia competir com a gentamicina em canais de cátion permeantes a cálcio.

Nos experimentos do presente trabalho, a exposição de monocamadas de células MDCK C11 às soluções com alto cálcio não modificou a $[Ca^{2+}]_i$, conforme mostra a Figura 7. Quando gentamicina 0,1 mM é adicionada às soluções com cálcio alto, o efeito que este aminoglicosídeo promove sobre a $[Ca^{2+}]_i$ foi inibido (Figura 8). Quando a concentração fisiológica de cálcio (1.8 mM) estava presente nas preparações com gentamicina, o pico de cálcio intracelular observado aumentou, o que não aconteceu para concentrações de 3,6 e 5,4 mM (Figura 9). Portanto, aumento no cálcio extracelular, por si só, não seria responsável por um significativo aumento na $[Ca^{2+}]_i$. Em contrapartida, concentrações maiores de cálcio no meio extracelular estariam, de alguma maneira, inibindo a ação da gentamicina.

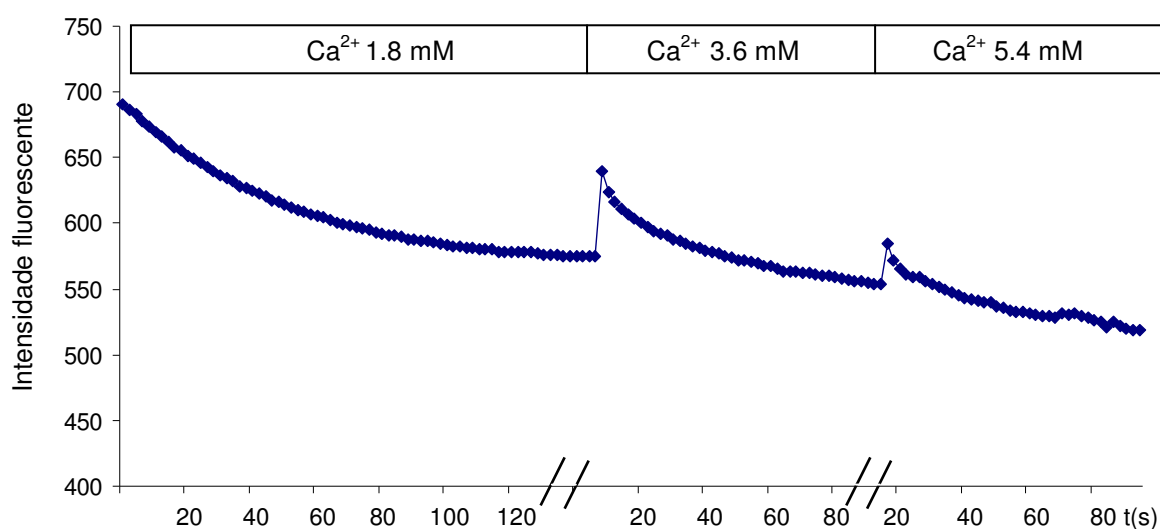


Figura 7: Variação da $[Ca^{2+}]_i$ com cálcio alto

Nota: Registro da $[Ca^{2+}]_i$ das células MDCK C11 expostas a três diferentes concentrações de cálcio no meio extracelular, em intervalos de 10 minutos: 1.8mM (fisiológica), 3.6mM e 5.4mM.

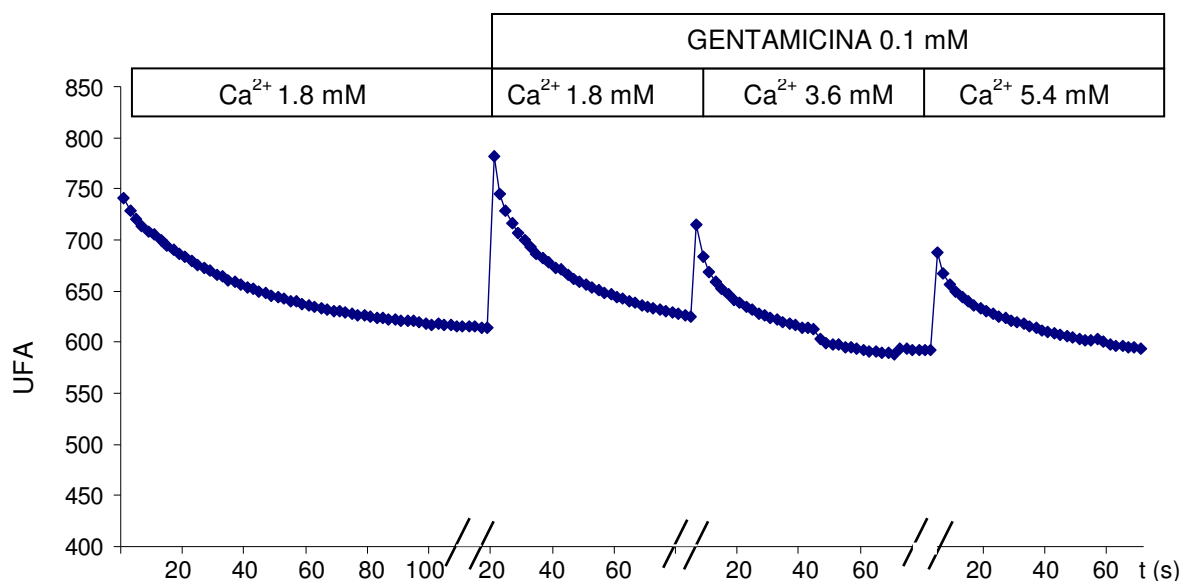


Figura 8: Variação da $[Ca^{2+}]_i$ com cálcio alto mais gentamicina

Nota: Registro da $[Ca^{2+}]_i$ das células MDCK C11 expostas a três diferentes concentrações de cálcio no meio extracelular, em intervalos de 10 minutos: 1.8mM (fisiológica), 3.6mM e 5.4mM, todas acrescidas de 0,1mM de sulfato de gentamicina.

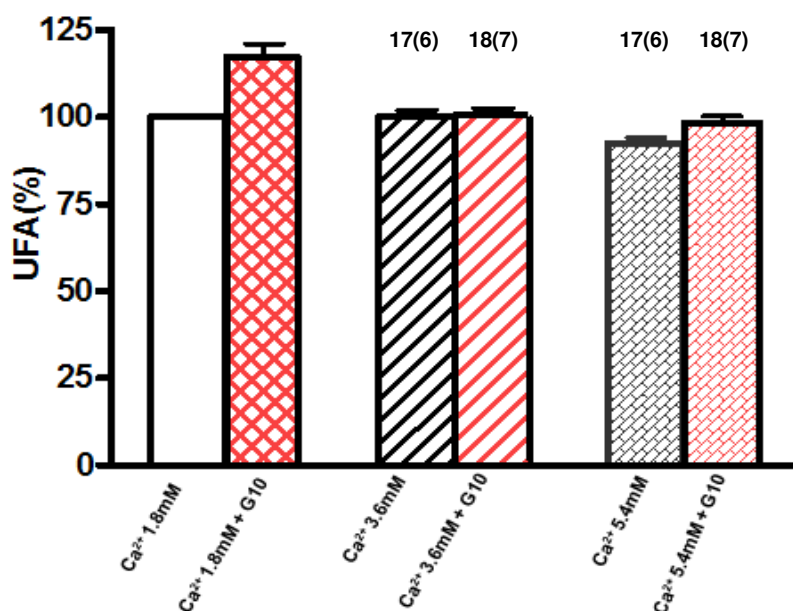


Figura 9: Variação da $[Ca^{2+}]_i$ com cálcio alto e com cálcio alto mais gentamicina

Nota: Valores médios dos percentuais de variação na fluorescência (UFA%) emitida após excitação com FLUO-4, que indicam variações na $[Ca^{2+}]_i$, comparados a uma média hipotética (C=Controle 100%). G10 correspondem ao percentual de variação em células incubadas com sulfato de gentamicina 0,1 mM, por 10 minutos. As variações na intensidade fluorescente obtidas para concentrações altas de cálcio na solução de incubação (Ca^{2+} 3,6 mM e 5,4 mM) são comparadas com ensaios contendo gentamicina (Ca^{2+} 3,6 mM e 5,4 mM+G10).

4.2. REGISTRO DO pH INTRACELULAR

Células MDCK C11 apresentam mecanismos de extrusão de prótons como o trocador Na^+/H^+ , a H^+ -ATPase do tipo vacuolar e a H^+/K^+ -ATPase, que contribuem para o processo de acidificação da urina e para regulação pH_i . Nestes experimentos, quando expostas à solução livre de sódio, (Solução 2 da Tabela de Soluções), apresentaram queda no pH_i , devido à inibição do trocador Na^+/H^+ . A Figura 10 mostra a velocidade de acidificação nestas condições, que foi da ordem de $0,0031 \pm 0,0003$ unidades de $\text{pH}/\text{segundo}$. Quando as MDCK C11 foram expostas à solução contendo sódio (Solução 1 da Tabela de Soluções), acrescida de 0,1 mM de sulfato gentamicina, a velocidade de acidificação aumentou significativamente ($0,0077 \pm 0,0005$ unidades de $\text{pH}/\text{segundo}$, $p < 0,0001$) – Figura 11. Estes valores médios estão representados na Figura 12. A diferença entre o pH_i nos primeiros 10 segundos de excitação e o pH_i após os 120 segundos (ΔpH_i) é mostrada na Figura 12.

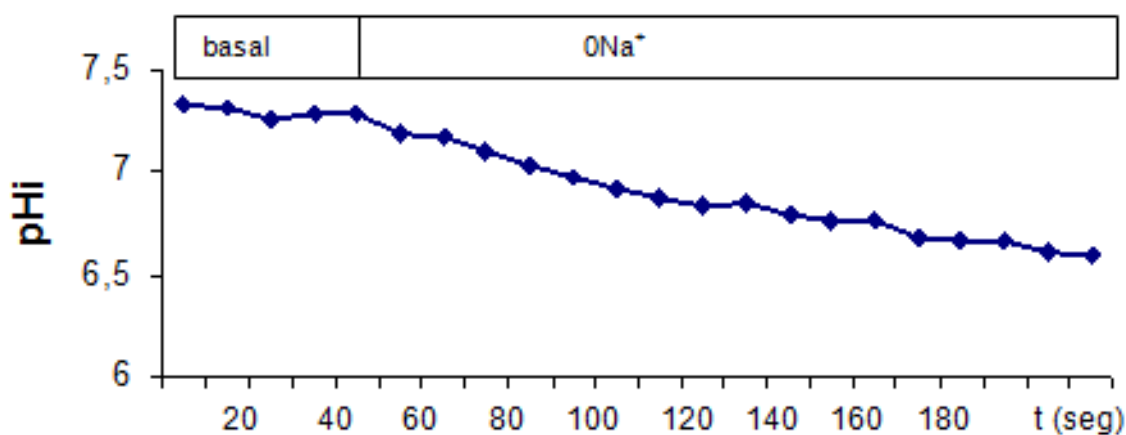


Figura 10: Velocidade de acidificação do pH_i de células MDCK C11 na ausência de sódio (0Na^+)

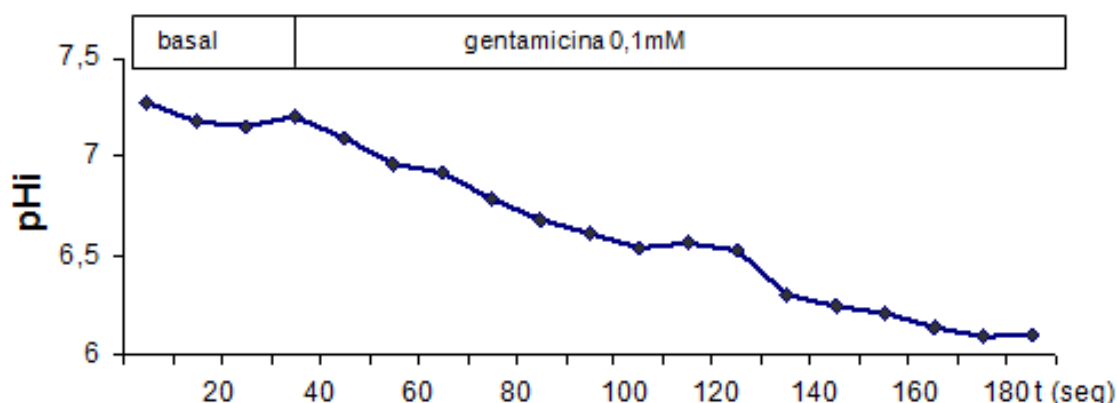


Figura 11: Velocidade de acidificação do pHi de células MDCK C11 expostas à solução 0,1 mM de sulfato de gentamicina

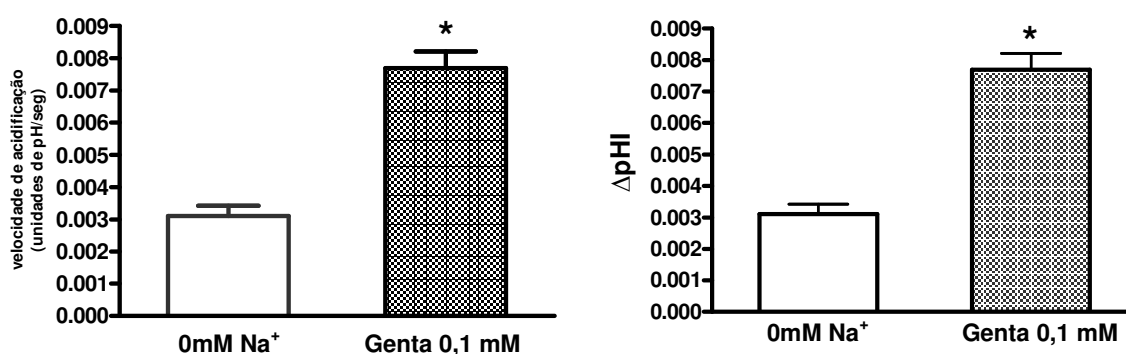


Figura 12: Valores médios de acidificação do pHi e ΔpHi

Nota: A esquerda estão os valores médios de acidificação em unidades de pH por segundo e a direita está a diferença entre os primeiros e os últimos registros pós exposição das MDCK C11 à gentamicina (Genta) ou 0Na⁺. * = $p < 0.001$

Quando as células foram expostas às mesmas condições descritas acima, mas após a incubação com Acridine Orange, foi possível observar que a intensidade fluorescente nas lamínulas tratadas com gentamicina foi maior que nas tratadas com solução livre de sódio. Este resultado é decorrente da maior densidade de vesículas ácidas observadas a partir da ação do fluoróforo, o que é condizente com a maior acidificação do meio (Figura 13). Estas vesículas poderiam representar um conteúdo maior de H⁺- ATPases vacuolares que estão migrando em direção à superfície da membrana, o que acontece quando o trocador Na⁺/H⁺ está inibido na ausência de sódio, assim como descrito por Malnic e Geibel (2000), trabalhando com depleção de cloreto em segmento S3 de

túbulo proximal. Entretanto, é preciso ressaltar que as preparações com gentamicina foram feitas na presença de sódio. Portanto, ou a gentamicina tem algum efeito sobre o trocador Na^+/H^+ , ou estas vesículas estariam representando apoptose induzida por cálcio, como sugerem os demais resultados deste trabalho.

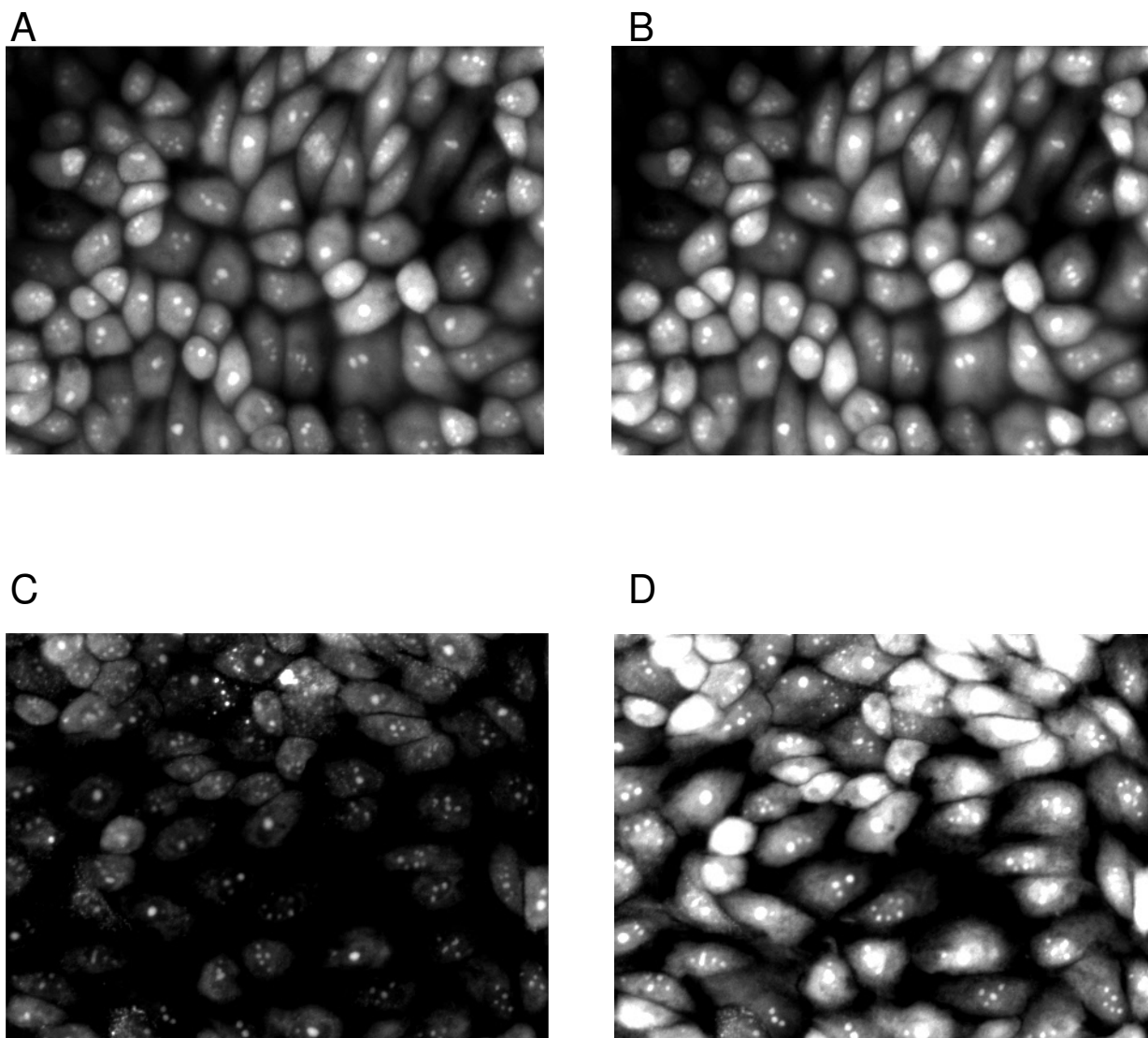
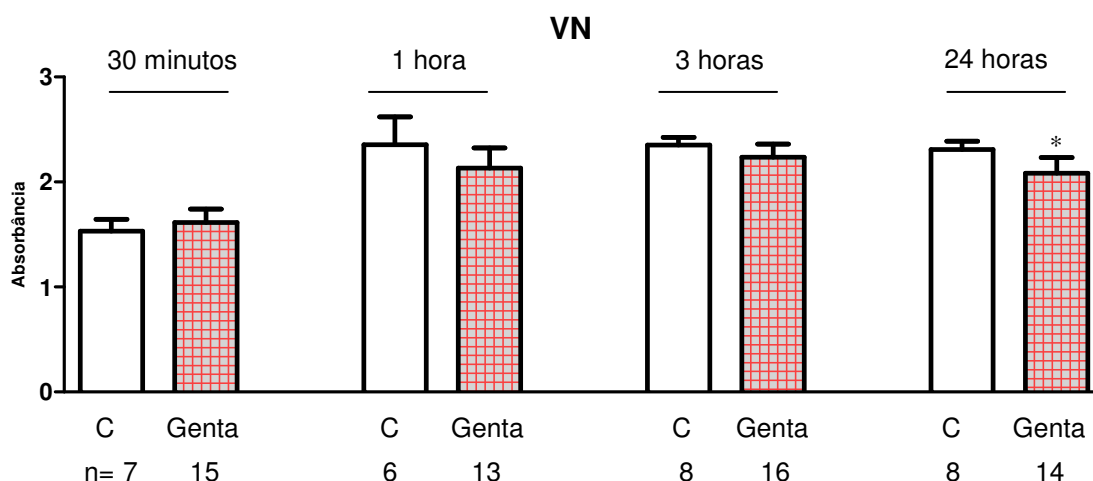


Figura 13: Registro de vesículas ácidas

Nota: Registros fluorescentes de monocamadas de células MDCK C11 incubadas por 3 minutos com Acridine Orange $10\mu\text{M}$. Em A, registro inicial imediatamente após 2 minutos de exposição à solução 0mM de Na^+ (Solução 2 da Tabela de Soluções); em B o registro obtido após 1 minuto de excitação do fluoróforo. Em C, registro inicial imediatamente após 2 minutos de exposição à solução 135 mM de Na^+ (Solução 1 da Tabela de Soluções) adicionada de sulfato gentamicina $0,1\text{mM}$; em D, registro obtido após 1 minuto de excitação do fluoróforo. (Aumento $20\times$).

4.3. VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULAR

A viabilidade das células MDCK C11 foi determinada através do método do Vermelho Neutro, que consiste em avaliar a capacidade endocítica da célula através da mensuração da absorbância do corante. Nestes experimentos, foram avaliadas mudanças na capacidade de endocitose da célula, expondo-as à gentamicina nos diferentes tempos de 30 minutos, 1 hora, 3 horas e 24 horas. (Figura 14). Foram obtidos valores de absorbância significativamente diferentes comparando-se os grupos controle 24 horas e o tratamento com gentamicina por 24 horas. Portanto, com 24 horas de tratamento com o antibiótico, ocorre um comprometimento da integridade da membrana, tornando-a menos capaz de realizar o processo de endocitose de forma eficiente.

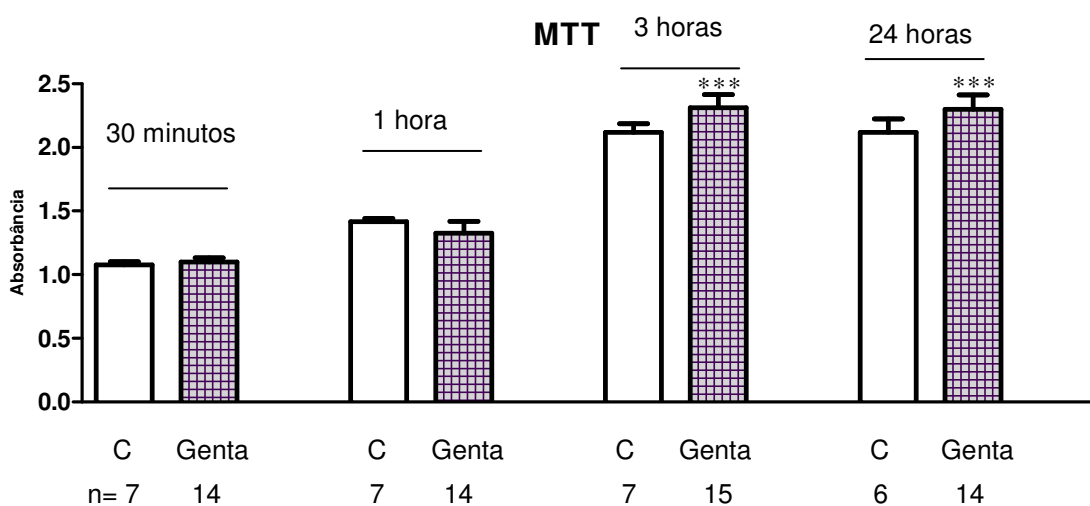


* $p < 0,05$ X C

Figura 14: Absorbância do corante vermelho neutro pelas células MDCK C11 (C= Controle; Genta = Gentamicina).

Utilizando-se o método do MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), foi determinado se a adição da gentamicina às células MDCK C11 pode causar algum efeito tóxico. A redução do anel tetrazólico do MTT pela enzima succinato desidrogenase, presente no interior das mitocôndrias, resulta na formação de cristais de formazan de cor roxa, que se acumulam no interior das células por serem impermeáveis à membrana. A partir da absorbância dos cristais de

formazan, foi possível determinar a atividade mitocondrial das células MDCK C11 (Figura 15). Assim, foram obtidos os seguintes resultados: comparando-se as células que foram mantidas por 3 horas em situação controle com as células que foram mantidas por 3 horas com gentamicina, foi encontrada uma diferença de absorbância dos cristais de formazan bem significativa, sendo maior nas células expostas ao antibiótico. Da mesma forma, comparando-se as células que foram mantidas por 24 horas em situação controle e por 24 horas adicionadas de gentamicina, a diferença na absorbância também foi elevada, sendo maior nas células tratadas com gentamicina. Logo, células MDCK C11 expostas à gentamicina exibiram um grande aumento da atividade mitocondrial já com um período de exposição de 3 horas e, também, de 24 horas.



*** $p < 0,001$ x C 3 horas

*** $p < 0,001$ x C 24 horas

Figura 15: Absorbância do MTT pelas células MDCK C11 (C= Controle; Genta = Gentamicina)

4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As análises ultraestruturais em MEV (Figura 16) demonstraram que as células MDCK C11 controles 3 horas e 24 horas e, também, as tratadas com gentamicina 3 horas e 24 horas, se mostram células com tamanho regular (▷).

São células morfologicamente hexagonais, como pode ser bem observado nas imagens D e H, bem aderidas ao substrato. Tanto as células controle como as tratadas com o antibiótico não apresentaram expansões celulares na forma de filopódios. Quando o fizeram, evidenciam estes de forma polarizada e esparsa (➡), como pode ser observado nas imagens D e L. Na imagem L, os filopódios se apresentaram de forma mais proeminente. Sobre a superfície celular de todas as células controles e tratadas percebe-se inúmeras projeções na forma de microespículas (➡), o que fica bem evidente nas imagens C G, K e O. As células controles e tratadas com gentamicina nas imagens B, F, J e N, evidenciam células arredondadas (↪) as quais provavelmente são células em processo de morte celular, bem como material particulado depositado por toda superfície das células.

De forma evidente na imagem (M), somente quando as células foram impostas ao tratamento com gentamicina por 24 horas, estas se soltaram do substrato em uma monocamada (➡). Após tratamento, estas células não perderam a adesão intercelular, mas perderam a adesividade ao substrato. Pode-se inferir que possa estar havendo comprometimento da adesão destas a matriz extracelular (MEC), possivelmente por uma modulação nos receptores que viabilizam a adesão destas células. Em especial interesse, pode-se citar as integrinas e os proteoglicanos de heparam sulfato (sindecan), que são biomoléculas envolvidas na dinâmica de adesão celular e em demais eventos fisiológicos. Pode-se ainda inferir que a perda de adesividade ao substrato pode também ser em decorrência de um possível remodelamento da matriz extracelular. Para tanto, demais ensaios devem ser efetuados, como análise da quantidade destes receptores e co-receptores de superfície celular (integrinas e sindecan), imunomarcagem de biomoléculas da MEC e ensaio de adesão e ou migração sobre diferentes substratos (fibronectina, laminina, vitronectina).

Nas análises em MEV evidenciou-se que há duas populações celulares nas células tratadas por 24 horas com gentamicina. Na imagem O, vê-se uma das populações, que se apresenta de forma mais proeminente e mantendo as características de células hexagonais. Acrescida a esta população há uma segunda subpopulação (P), as quais tiveram um estímulo a aumentar muito o grau de espraiamento celular, sendo estas células bem maiores e bem mais alongadas (➡).

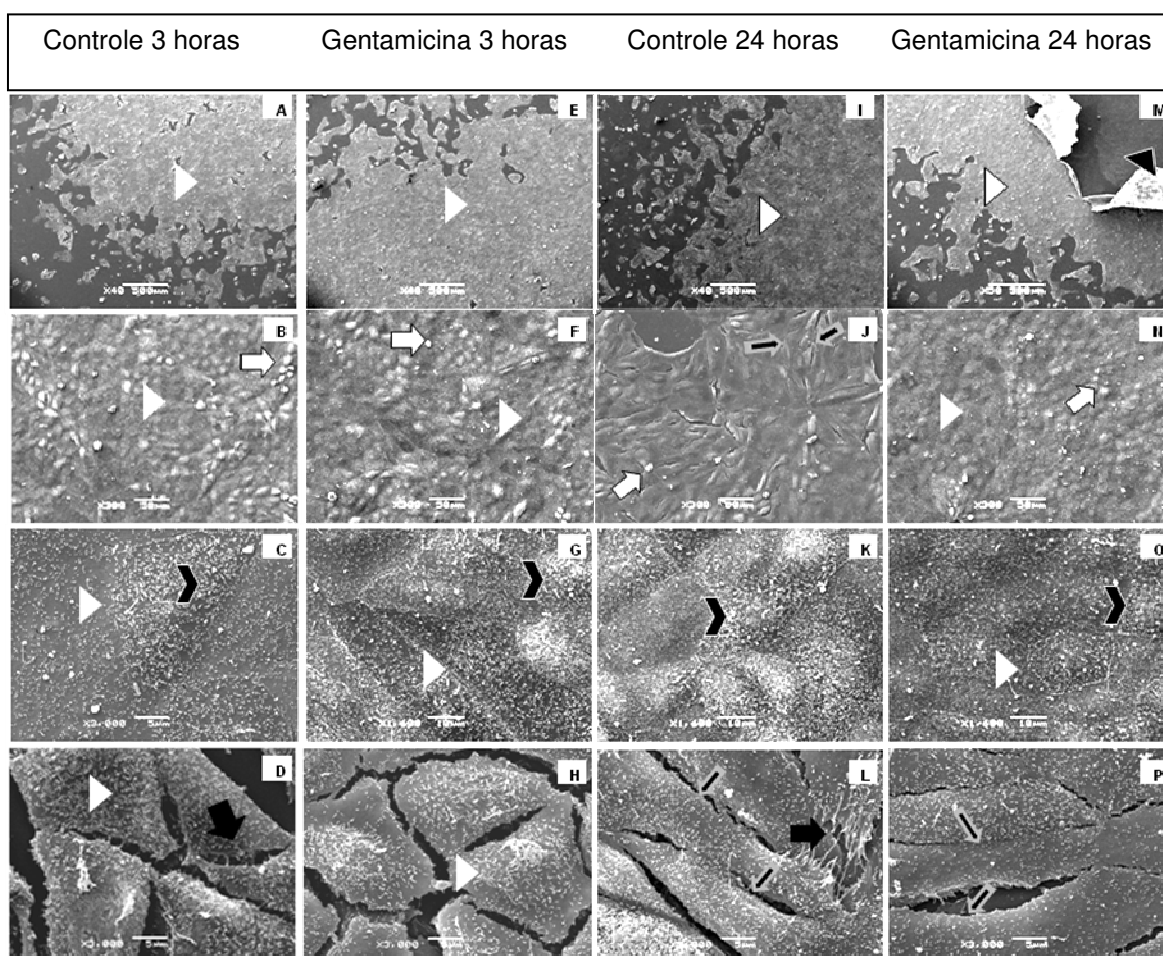


Figura 16: Análise ultraestrutural em MEV das células MDCK C11 expostas à gentamicina por 3 horas e 24 horas

Nota: As imagens A, B, C e D evidenciam as células controle mantidas no cultivo celular por 3 horas. As imagens E, F, G e H evidenciam as células tratadas com gentamicina e mantidas no cultivo celular por 3 horas. As imagens I, J, K e L evidenciam as células controle mantidas no cultivo celular por 24 horas. As imagens M, N, O e P evidenciam as células tratadas com gentamicina e mantidas no cultivo celular por 24 horas.

Os resultados da Figura 17, que demonstram a exposição por 30 minutos à gentamicina (imagem A, B e C) e por 1 hora (D, E e F), evidenciam que a grande maioria das células mantêm suas características morfológicas e ultraestruturais. Portanto, são células hexagonais e bem aderidas ao substrato. Somente foi possível observar algumas pequenas alterações em forma de colônias celulares esparsas ao longo do cultivo celular. Estas colônias apresentam células de aspecto mais protuso (↵), com uma quantidade de microespículas em maior número que as já observadas nas demais células (➤), por sobre toda a superfície destas. Por sobre o cultivo, pode-se ainda observar

material depositado de forma fibrilar (➤) em maior quantidade quando que comparado aos demais tempos de exposição.

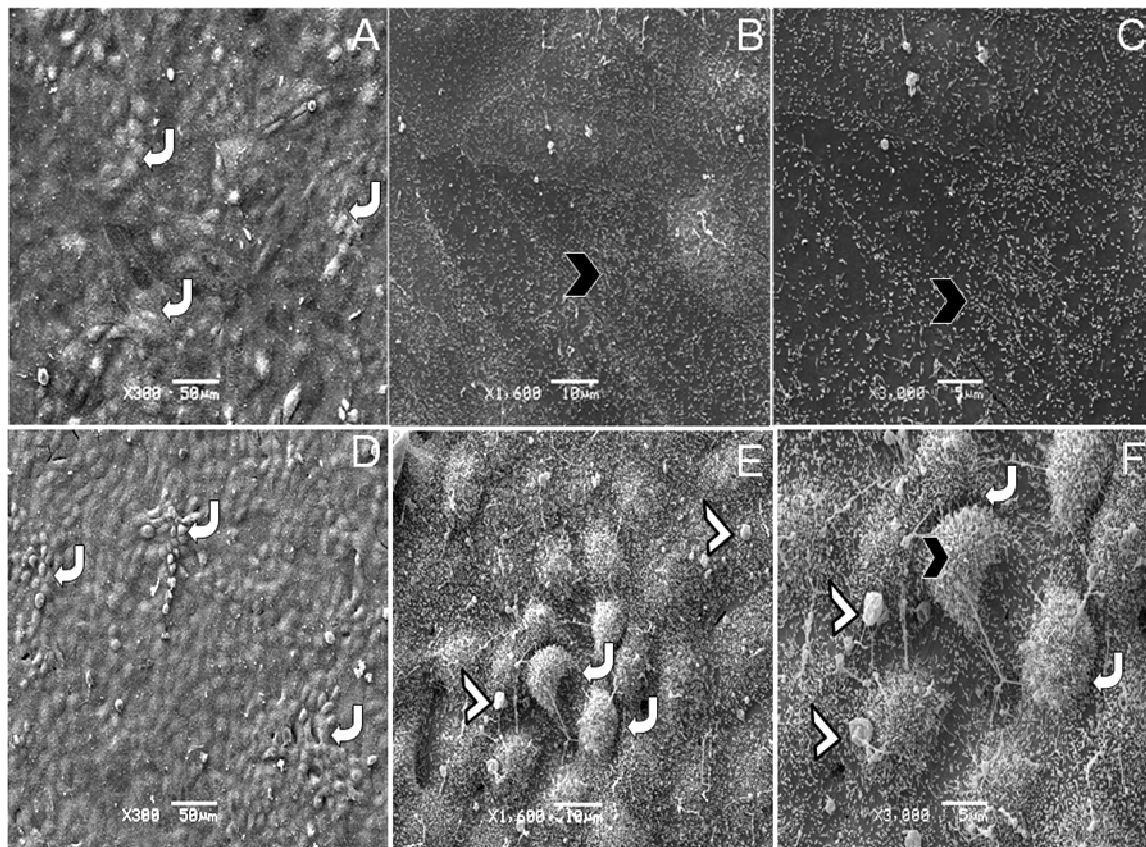


Figura 17: Análise ultraestrutural em MEV das células MDCK C11 expostas à gentamicina por 1 hora e 30 minutos

Nota: As imagens A, B e C evidenciam as células controle mantidas no cultivo celular por 30 minutos. As imagens D, E e F evidenciam as células tratadas com gentamicina mantidas no cultivo celular por 1 hora.









	Esta cabeça de seta identifica a morfologia padrão da linhagem celular de aspecto hexagonal, bem aderida ao substrato e crescendo em monocamada;
	Esta seta identifica o padrão alterado da morfologia celular, com células bem alongadas e bem espalhadas por sobre o substrato;
	Esta seta identifica células arredondadas desaderidas do substrato, possivelmente células em processo de morte celular;
	Esta seta identifica características de expansões na forma de filopódios;
	Esta seta identifica, nas imagens de menor magnitude, que as células tratadas por 24 horas apresentaram nítido desprendimento do substrato (perda de adesão célula-matriz extracelular). Estas se soltam na forma de um "tapete celular", em uma monocamada,
	Esta seta identifica intensa formação de microespiculas por sobre a superfície celular;
	Esta seta identifica colônias de células com aspecto mais protuso;
	Esta seta identifica a presença de material fibrilar depositado.

Tabela 2: Símbolos utilizados para analisar a MEV

5. DISCUSSÃO

O antibiótico aminoglicosídeo gentamicina é capaz de provocar danos em células renais, tanto tubulares como glomerulares. A maior parte dos achados mostra que a ação da gentamicina é predominante em células tubulares proximais, enquanto para as células tubulares distais poucos relatos são encontrados na literatura. A principal via de ação deste antibiótico em células do túbulo proximal é a via endocítica (SERVAIS *et al.*, 2005). A endocitose é um importante mecanismo de reabsorção de proteínas na borda em escova deste epitélio tubular. Entretanto, mesmo em células proximais, vias não endocíticas de ação da gentamicina tem sido demonstradas (MYRDAL, JOHSON e STEYGER 2005). Já em células distais e em células do ducto coletor, a via endocítica não é predominante no que se refere a mecanismos de reabsorção. Portanto, vias não endocíticas como a via TRPV, são descritas como vias de ação da gentamicina em células MDCK e KDT3 (MYRDAL e STEYGER, 2005; KARASAWA *et al.*, 2008).

Assim como o gadolínio, a neomicina e a tobramicina, a gentamicina também é conhecida como agonista dos receptores sensíveis a cálcio (WARD 2002, 2005). Quando CaSR é estimulado, ativa-se a via IP_3 , promovendo a saída de cálcio do retículo endoplasmático. No presente trabalho, células MDCK C11, incubadas por 10 minutos com 0,1mM de solução de sulfato de gentamicina, apresentaram aumento na $[Ca^{2+}]_i$ maior do que aquele obtido com a utilização de gadolínio (Figura 4), indicando que a gentamicina poderia ter um efeito mais acentuado na ativação deste receptor. Entretanto, é possível que a gentamicina esteja estimulando a entrada de cálcio por outras vias que não a do CaSR e que, estas vias são capazes de mobilizar cálcio, uma vez que o aumento na $[Ca^{2+}]_i$ é mantido mesmo na presença de tapsigargina (Figura 6). Agora, na presença de Bapta não há modificação na $[Ca^{2+}]_i$, mesmo na presença de gentamicina, pois esta droga é capaz de quelar todo o cálcio citoplasmático.

O aumento maior do que 30% no cálcio intracelular pode ser o responsável por desencadear o efeito tóxico deste aminoglicosídeo nas células MDCK C11. Esse efeito não depende de via endocítica, mas de estimulação de

cálcio por cálcio, uma vez que na ausência de cálcio no meio extracelular (EGTA), a $[Ca^{2+}]_i$ permanece em nível basal.

Com o aumento das concentrações de cálcio no meio extracelular, não se observou aumento no pulso de cálcio intracelular e ainda, na presença de cálcio alto (3,6 e 5,4 mM), o efeito da gentamicina foi abolido (Figuras 8 e 9). Como já mencionado, Karasawa *et al.* 2008, trabalhando com células de camundongo semelhantes às do néfron distal, demonstraram que utilizando altas concentrações extracelulares de cálcio, a captação de gentamicina por via não endocítica – TRPV, diminui, sugerindo mecanismo envolvendo competição. Em contrapartida, nestes experimentos, não foi observado aumento na $[Ca^{2+}]_i$ se concentrações altas deste íon são adicionadas ao meio extracelular, mesmo na ausência de gentamicina (Figuras 7 e 9). Ao que parece, estimulação do CaSR não é a única via não endocítica de ação da gentamicina, responsável pela toxicidade.

É necessário ressaltar que a via endocítica, em células do néfron distal, não pode ser descartada. O fato de a gentamicina, por via endocítica, provocar toxicidade ao entrar na célula, se deve ao seu acúmulo nos lisossomos, que leva ao rompimento da membrana lisossomal e consequente apoptose (MOESTRUP *et al.*, 1995; SERVAIS *et al.*, 2005; QUIROS *et al.*, 2011). Aumento do $[Ca^{2+}]_i$ também está relacionado ao processo de morte celular programada (WEGIERSKI *et al.*, 2009). A estimulação do CaSR por aminoglicosídeos, incluindo gentamicina, ativa apoptose principalmente via mitocondrial (GIBBONS *et al.*, 2008; QUIROS *et al.*, 2011; Xu, 2005). Além disso, as Mudanças na $[Ca^{2+}]_i$ podem interferir na regulação do pH intracelular (OLIVEIRA-SOUZA e MELLO-AIRES, 2001).

Fernandez, Oliveira-Souza e Malnic (2000) determinaram diferentes mecanismos de recuperação do pH_i para o subtipo C11, incluindo um trocador Na^+/H^+ e uma H^+ -ATPase sensível à concanamina nas membranas apical e basolateral e uma H^+/K^+ -ATPase sensível a Schering 28080 na membrana apical. O bombeamento de prótons pela H^+ -ATPase e H^+/K^+ -ATPase, são independentes de sódio e dependentes de cloreto (TARARTHUCH, FERNANDEZ e MALNIC, 2007). Portanto, na ausência de sódio ocorre inibição do trocador Na^+/H^+ e a extrusão de H^+ do meio intracelular é feita pelas bombas de prótons. A H^+ -ATPase presente nas células renais é do tipo vacuolar. A H^+ -ATPase

vacuolar ou V-ATPase pertence à família de bombas de prótons ATP-dependentes presentes numa variedade de compartimentos intracelulares (HARVEY, 1992; FORGAC, 1999). V-ATPases estão também presentes na membrana plasmática de certas células especializadas, incluindo osteoclastos (CHATTEJEE *et al.*, 1992) e células intercaladas dos túbulos renais (GLUCK, 1993; FERNANDEZ, OLIVEIRA-SOUZA e MALNIC, 2000). A incorporação de vesículas contendo H^+ -ATPase, por exocitose, nas membranas plasmáticas é responsável pela regulação do pH intracelular de muitos tipos celulares (SCHWARTZ, BARASCH, AL-AWGATI, 1985). A diminuição do pH_i e o aumento no conteúdo de vesículas ácidas das células MDCK C11, tratadas com 0,1 mM de gentamicina, foram observados (Figuras 11 e 13). Uma maior presença de vesículas ácidas nas células poderia estar indicando: ou um aumento no número de lisossomos devido ao processo de morte celular programada que estaria sendo estimulado pela endocitose da gentamicina, ou que, estas células estariam tendo dificuldades para regular seu pH_i via trocador Na^+/H^+ . Malnic e Geibel, (2000), mostraram aumento no conteúdo de vesículas ácidas na ausência de sódio e migração destas vesículas para a superfície celular, indicando mobilização da H^+ -ATPase. A gentamicina poderia estar de alguma maneira inibindo o trocador Na^+/H^+ , o que também levaria a uma mobilização de vesículas contendo a bomba de prótons. Estes dados são insuficientes para qualquer conclusão a respeito e podem ser objeto de futuras investigações.

Fato um pouco mais evidente é de que o aumento do cálcio no meio intracelular, da quantidade de vesículas ácidas e também da acidificação das células promovidos pela gentamicina, poderia indicar que estas células estão entrando em processo de apoptose.

Foi avaliada a viabilidade das células MDCK C11 expostas à gentamicina. Com 24 horas de exposição, estas células demonstraram uma menor capacidade de endocitose do corante vermelho neutro, ou seja, apresentaram perda da integridade da membrana plasmática (Figura 14). Quanto à avaliação da citotoxicidade provocada pela gentamicina, as células MDCK C11 apresentaram um significativo aumento da atividade mitocondrial já com 3 horas de exposição ao antibiótico, o que poderia indicar um estresse metabólico. Conforme foi demonstrada na Figura 5, a gentamicina promove aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Segundo

Wegierski *et al.*, (2009), uma grande concentração de cálcio liberada pelo RE, promove uma consequente grande captação de cálcio pelas mitocôndrias. Nestas organelas, o cálcio elevado acaba ativando vias que levam a célula à apoptose e o processo de apoptose requer ATP, ao menos nas etapas iniciais. Isto explicaria o aumento da atividade mitocondrial nos tempo de 3 e 24 horas de exposição à gentamicina, (Figura 15), determinado pela maior absorbância do MTT de forma significativa em relação às células controle.

As análises em Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram que a gentamicina é capaz de promover mudanças ultraestruturais e morfológicas nas células MDCK C11. Sob efeito mais prolongado do aminoglicosídeo (24 horas), as culturas celulares não conseguem se manter aderidas (Figura 16), perdendo aderência com a matriz extracelular (MEC). A visão que se deve ter sobre MEC é dinâmica, como descrito por Hay, (1981), a qual menciona que a “célula” uma vez sintetizando e secretando os constituintes da MEC (um conjunto de agregados supramoleculares constituídos por colágenos, glicoproteínas e proteoglicanos), esta mantém a interação com estas biomoléculas, formando assim uma contínua relação estrutural e de intercâmbio funcional entre o citoplasma, a membrana celular e a própria matriz extracelular. Dentre inúmeras moléculas relacionadas com a MEC, podem-se destacar as integrinas, as quais são glicoproteínas (GPs) transmembrana, possuindo domínios α e β , sendo receptores de membrana. Estas biomoléculas interligam o citoesqueleto interno de uma célula, com a matriz extracelular (HYNES, 1987; HAAS e PLOW, 1997). Dentre as proteínas de MEC com as quais as integrinas interagem, pode-se citar a fibronectina, laminina, vitronectina. Esta interação é modulada via proteínas citoplasmáticas como a vinculina, a talina e a α -actinina, as quais interagem com as integrinas e também com as proteínas do citoesqueleto e estão envolvidas nas dinâmicas de adesão, invasão, migração e proliferação celular (WOODS e COUCHMANN, 2000).

O Sindecán é um proteoglicano de superfície celular, que pode atuar como co-receptor de fatores de crescimento e proteínas da MEC, aumentando a afinidade destas moléculas a seus receptores específicos e também participa da adesão celular nos contatos focais juntamente com integrinas e FAK (quinase de adesão focal), conectando a MEC ao citoesqueleto. Dessa forma, acredita-se que a perda da aderência ao substrato das células MDCK C11, tratadas por 24 horas

com gentamicina, estaria relacionada com alguma alteração da atividade de proteínas de membrana como as integrinas e o sindecan. Ainda na Figura 16, observou-se que estas células expostas à gentamicina por 24 horas, apresentaram um grau de espraçamento celular superior comparativamente aos demais tempos de exposição. Este fato pode ser interpretado como uma tentativa das células MDCK C11 em continuarem aderidas ao substrato. Nas células tratadas com gentamicina por 1 hora e 30 minutos, (Figura 17), é interessante destacar a presença de células com aspecto mais protuso, grande quantidade de microespículas e deposição de material fibrilar.

Todos estes achados demonstram que o efeito tóxico da gentamicina sobre células do ducto coletor podem levar à mudanças no metabolismo destas células, de forma a promover a morte celular, o que contribui para a progressão da insuficiência renal aguda.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a gentamicina, em células MDCK C11, é capaz de promover um aumento significativo da $[Ca^{2+}]_i$ e que, esse aumento é dependente da presença de cálcio no meio extracelular. A gentamicina pode promover o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ por outras vias além do estímulo do CaSR. A $[Ca^{2+}]_i$ nestas células aumenta mais sob estímulo da gentamicina quando que comparado ao estímulo promovido pelo Gd^{3+} . Em relação ao pH_i dessas células, o antibiótico promove acidificação superior àquela observada na presença de solução sem sódio. A gentamicina é capaz de alterar viabilidade, atividade mitocondrial e morfologia das células MDCK C11.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALAKUMAR, P.; ROHILLA, A.; THANGATHIRUPATHI, A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? **Pharmacological Research**, v. 62, p. 179-186, 2010.

BENHAM, C.D.; DAVIS, J.B.; RANDALL, A.D. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 873-878, 2002.

BERNE e LEVY. **Fisiologia**, 6^a Ed., Editora Elsevier, 2009.

BLANKENSHIP, K.A.; WILLIAMS, J.J.; LAWRENCE, M.S.; MCLEISH, K.R.; DEAN, W.L.; ARTHUR, J.M. The calcium-sensing receptor regulates calcium absorption in MDCK cells by inhibition of PMCA. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 280, p. 815-822, 2001.

BORENFREUND, E.; PUENER, J. A. A. Simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **J. Tissue Cult. Meth**, v. 9, p. 7-9, 1984.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; DA SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O.C; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211(1), p. 64-77, 2006.

CHATTEJEE, D.; CHAKABORTY, M.; LEIT, M.; NEFF, L.; JAMSA-KELLOKUMPU, S.; FUCHS, R.; BARON, R. The osteoclast proton pump differs in pharmacological and catalytic subunits from others vacuolar H⁺ - ATPases. **J Exp Biol**, v.172, p. 193-204, 1992.

CHEN. L.; WANG, W.Q. Frequency perception and cell injury in the semicircular canal caused by gentamicin. **J. Otolaryngology Head & Neck Surgery**, v. 40(6), p. 446-452, 2011.

COIMBRA, T. M.; LACHAT. J.J. 1988. Analysis of urinary albumin excretion in gentamicin-treated rats. **Nephron**, v. 49, p. 154-159, 1988.

COOPER, G.M. **A Célula**, 2^a Ed., *Editora Artmed*, 2002.

DAVIES, J; DAVIS B.D. Misreading of Ribonucleic Acid Code Words Induced by Aminoglycoside Antibiotic. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 3312-3316, 1968.

FALCO, F.G.; SMITH, H.M.; ARCIERI, G.M. Nephrotoxicity of aminoglycosides and gentamicin. **J. Infectious Diseases**, v. 119(4), p. 406-409, 1969.

FERNANDEZ, R.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G. Na⁺ -independent próton secretion in MDCK-C11 cells. **Pflugers Arch**, v. 441, p. 287-293, 2000.

FERRI, K.F.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nat. Cell Biol**, v. 3, p. 255-263, 2001.

FORGAC, M. The vacuolar H⁺ - ATPase of clathrin-coated vesicle is reversible inhibited by S-nitroso-glutathione. **J Biol Chem**, v. 274, p. 12951-12954, 1999.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171–177, 2006.

FRANCESCATO, H.D.; CHIERICE, E.C.S.; MARIN, F.Q; CUNHA, R.S.; COSTA, C.G.A.; COIMBRA, T.M. Effect of endogenous hydrogen sulfide inhibition on structural and functional renal disturbances induced by gentamicin. **Braz J Med Biol Res**, v. 45(3), p. 244-249, 2012.

GEKLE, M.; WÜNSCH, S.; OBERLEITHNER, H.; SILBERNAGL, S. Characterization of two MDCK cells subtypes as model system to study principal cell and intercalated cell properties. **Pflügers Arch**, v. 428, p. 157-162, 1994.

GLUCK. S.L. The vacuolar H⁺ - ATPase: versatile proton pumps participating in constitutive and specialized functions of eukaryotic cells. **Int Rev Cytol**, v. 137, p. 105-137, 1993.

GIBBONS, C.E.; MALDONADO-PÉREZ, D.; SHAH, A.N.; RICCARDI, D.; WARD, D. T. Calcium-sensing receptor antagonism or lithium treatment ameliorates aminoglycoside-induced cell death in renal epithelial cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1782(3), p. 188-195, 2008.

GUICCIARDI, M.E.; LEIST, M.; GORES, G.J. Lysosomes in cell death. **Oncogene**, v. 23, p. 2881-2890, 2004.

GUYTON & HALL – **Fisiologia Médica**, 11^a .Ed., Editora Elsevier, 2006.

HASS, T.A., PLOW, E.F. Structural models of the cytoplasmic domain of alpha(IIb)beta(3). **Thrombosis and Haemostasis**, p.2455, 1997.

HAY, E. D. Extracellular Matriz. **The Journal of Cell Biology**. v. 91, p. 205-223, 1981.

HARVEY, W. R. Physiology of V-ATPases. **J. Exp. Biol**, v. 172, p. 1-17, 1992.

HYNES, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v.48, p.549-550, 1987.

JENSEN-SMITH, H.C.; HALLWORTH, R.; NICHOLS, M.G. Gentamicin Rapidly Inhibits Mitochondrial Metabolism in High-Frequency Cochlear Outer Hair Cells. **PloS One**, v. 7(6), e38471, 2012.

KARASAWA, T.; WANG, Q; FU, Y.; COHEN, D.M.; STEYGER, P.S. TRPV4 enhances cellular uptake of aminoglycoside antibiotics. **J. Cell Sci**, v. 121(17), p. 2871-2879, 2008.

LANG, F.; PAULMICH, M. Properties and regulation of ions channels in MDCK cells. **Kidney Int**, v. 48, p. 1200-1205, 1995.

LAUNAY, P.; FLEIG, A.; PERRAUD, A.L.; SCHARENBERG, A.M.; PENNER, R.; KINET, J.P. TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. **Cell**, v. 109(3), p. 397-497, 2002.

MALNIC, G.; GEIBEL, J.P. Cell pH and H⁺ secretion by S3 segment of mammalian kidney: role of H⁺-ATPase and Cl⁻. **J Membr Biol**, v. 178, p. 115-125, 2000.

MARTÍNEZ-SALGADO, C.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. F.; LÓPEZ-NOVOA, M. J. 2007. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.223, p. 86 –98, 2007.

MELLO-AIRES, M. **Fisiologia**, 2^a Ed., *Editora Guanabara* - Koogan, 1999.

MELLO-AIRES, M. **Fisiologia**, 3^a Ed., *Editora Guanabara* - Koogan, 2008.

MOESTRUP, S. K.; CUI, S.; VORUM, H.; BREGENGARD, C.; BJORN, S.E.; NORRIS, K.; GLIEMANN, J.; CHRISTENSEN, E.I. Evidence that Glycoprotein 330/Megalin Uptake of Polybasic Drugs. **The American Society for Clinical Investigation**, Inc, v. 96, p. 1404-1413, 1995.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Meth**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MORIN, J.P.; VIOTTE, G.; VANDEWALLE, A.; VAN HOOFF, F.; TULKENS, P.; FILLASTRE, J.P. Gentamicin-induced nephrotoxicity: A cell biology approach. **Kidney International**, v. 18, p. 583-590, 1980.

MYRDAL, S.E.; JOHNSON, K.C.; STEYGER, P.S. Cytoplasmic and intra-nuclear binding of gentamicin does not require endocytosis. **Hear Res**, v. 204(1-2), p. 156-169, 2005.

MYRDAL, S.E.; STEYGER, P.S. TRPV1 regulators mediate gentamicin penetration of cultured kidney cells. **Hear Res**, v. 204, p. 170-182, 2005.

NOLASCO, F.E.; CAMERON, J.S.; HARTHLEY, B.; COELHO, A.; HILDRETH, G.; REUBEN R. Intraglomerular T cell and monocytes in nephritis, study with monoclonal antibodies. **Kidney Int**, v. 32, p. 1160-1167, 1987.

NOLLER, H.F. Ribosomal RNA and Translation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 191-227, 1991.

NORONHA, I.L.; FUJIHARA, C.K.; ZATZ, R. The inflammatory component in progressive renal disease-are interventions possible? **Nephrol Dial Transplant**, v. 1, p. 363–368, 2002.

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Effect of arginine vasopressin and ANP on intracellular pH and cytosolic free $[Ca^{2+}]$ regulation in MDCK cells. **Kidney International**, v. 60, p. 1800-1808, 2001.

QUIROS, Y.; VICENTE-VICENTE, L.; MORALES, A.I.; LÓPEZ-NOVOA, J.M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F.J. An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin. **Toxicological Sciences**, v. 119(2), p. 245-256, 2011.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem. Pharmacol**, v. 55, p. 803-810, 1998.

RUIZ-ORTEGA, M.; EGIDO, J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. **Kidney Int**, v. 52, p. 1497–1510, 1997.

SANTUCCI, R. A.; KRIEGER, J. N. Gentamicin for the practicing urologist: review of efficacy single daily dosing and “switch therapy”. **The Journal of Urology**, v. 163, p. 1076-1084, 2000.

SCHOR, N.; BOIM, M.A.; SANTOS, O.F.P. **Insuficiência Renal Aguda, Fisiopatologia Clínica e Tratamento**. Cap.1. Editora Sanviers, 1997.

SCHWARTZ, G.J.; BARASCH, J.; AL-AWGATI, Q. Plasticity of functional epithelial polarity. **Nature**. v. 318(6044), p. 368-371.

SERVAIS, H.; SMISSEN, P. V. DER.; THIRION, G.; ESSEN, G.V. DER; BAMBEKE, F.V.; TULKENS, P.M.; MINGEOT-LECLERC, M.P. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: Involvement of lysosomes and mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, p. 321-333, 2005.

SHEN, M.; CHOU, C.; CHIU, W. Streptomycin and its analogues are potent inhibitors of the hypotonicity-induced Ca^{2+} entry and Cl^- channel activity. **FEBS LETTERS**, v. 554, p. 494-500, 2003.

TARARTHUCH, A. L.; FERNANDEZ, R. ; MALNIC, G. Cl^- and regulation of pH by MDCK-C11 cells. **Braz J Med Biol**. v. 40, p.687-696, 2007

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J.C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 2656-2664, 2005.

WARD, D. T.; MCLARNON, S.J.; RICCARDI D. Aminoglycosides increase intracellular calcium levels and ERK activity in proximal tubular OK cells expressing the extracellular calcium-sensing receptor. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 13, p. 1481-1489, 2002.

WARD, D. T.; MALDONADO-PÉREZ, D.; HOLLINS, L.; RICCARDI, D. Aminoglycosides Induce Acute Cell Signaling and Chronic Cell Death in Renal Cells that Express the Calcium-Sensing Receptor. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 16, p. 1236-1244, 2005

WEGIERSKI, T.; STEFFL, D.; KOPP, C.; TAUBER, R.; BUCHHOLZ, B.; NITSCHKE, R.; KUEHN, E.W.; WALZ, G.; KOTTGEN, M. TRPP2. Channels regulate apoptosis through the Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum. **The EMBO Journal**, v. 28, p. 490-499, 2009.

WOODS, A.; COUCHMAN J.R. Integrin modulation by lateral association. **J. Biol. Chem**, v. 275, p.24233-24236, 2000.